



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS
EXPOSTOS A ANTIPARASITÁRIOS IMIDAZÓLICOS E
CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DO CITOCROMO
P4501A1**

Tatiani Karini Rensi Botelho

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Co-Orientadora: Prof^a Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa

FLORIANÓPOLIS

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS
EXPOSTOS A ANTIPARASITÁRIOS IMIDAZÓLICOS E
CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DO CITOCROMO
P4501A1**

TATIANI KARINI RENSI BOTELHO

FLORIANÓPOLIS

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS
EXPOSTOS A ANTIPARASITÁRIOS IMIDAZÓLICOS E
CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DO CITOCROMO
P4501A1**

Dissertação apresentada por **TATIANI KARINI RENSI BOTELHO** para
obtenção do Grau de Mestre em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

FLORIANÓPOLIS
2003

INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS EXPOSTOS A ANTIPARASITÁRIOS IMIDAZÓLICOS E CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DO CITOCROMO P4501A1

Dissertação defendida como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Mestrado, da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof^a Tânia Silvia Fröde, Dr^a (UFSC)

Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Danilo Wilhelm Filho, Dr. (UFSC)

Orientador

Prof^a Regina Vasconcelos Antônio, Dr^a (UFSC)

Prof^a Rosa Maria Ribeiro do Vale, Dr^a (UFSC)

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM,/...../2003.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Altino e Maria, à minha querida irmã Mariana e ao meu esposo Frederico, por todo amor e carinho transmitidos nos momentos em que meus ideais pareciam tão distantes e inatingíveis.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Danilo Wilhelm Filho pela orientação científica para realização deste trabalho.

À professora Rozangela Curi Pedrosa pela sábia co-orientação, apoio e amizade.

À professora Tânia Silvia Fröde pela competência e dedicação com que desempenhou a coordenação deste programa de pós-graduação.

Às professoras Regina Vasconcelos Antônio e Rosa Maria Ribeiro do Vale, por terem aceitado prontamente fazer parte da banca examinadora.

Às professoras Fátima Regina Mena Barreto e Tânia Beatriz C. Pasa, pela colaboração e compreensão ao longo deste trabalho.

À Deus, por ter me concedido a oportunidade de ser uma pessoa saudável e também por iluminar e guiar os meus passos com serenidade e tranquilidade nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Sr. Altino e Sra. Maria que além de me darem a vida, revestiram-na de amor e dedicação.

À minha querida irmã Mariana pelo exemplo de persistência e luta para a conquista de um objetivo.

Ao meu amado esposo Frederico pela paciência e por todo carinho nos momentos em que estive ausente.

À amiga Ana Lúiza Pamplona Mosimann que ajudou-me a superar alguns momentos difíceis desta caminhada com muita sabedoria e boa vontade.

Às amigas Graziella Eliza Ronsein e Gizéle Louise Milchert pelos cansativos dias de experimentos, que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos queridos amigos de laboratório, Rúbia, Lorena, Jean, Tatiana, Graciele, Débora, Jussara, Flávia, Fabíola e Michele por todo auxílio e companheirismo.

Aos amigos da Universidade Federal de Santa Catarina e àqueles que direta ou indiretamente tenham participado para a concretização deste objetivo.

SUMÁRIO

	ILUSTRAÇÕES	x
	LISTA DE ABREVIATURAS	xii
	RESUMO	xiii
	ABSTRACT	xiv
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	OBJETIVO GERAL	2
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	HELMINTOSES	4
3.2	DERIVADOS DO BENZOMIDAZOL.	4
3.3	DOENÇA DE CHAGAS	6
3.4	COMPOSTOS NITROIMIDAZÓLICOS	6
3.5	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	8
3.6	ESTRESSE OXIDATIVO X FÁRMACOS	10
3.7	DEFESAS ANTIOXIDANTES	12
3.7.1	Defesas Antioxidantes Enzimáticas	12
3.7.2	Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas	14
3.8	BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS	15
3.8.1	Citocromo P450	17
3.8.2	Ácido Glicurônico Uridina Difosfato Transferase (UGT)	20
3.9	INDUTORES E INIBIDORES DO CITOCROMO P4501A	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	ANIMAIS	24
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAIS	24
4.2.1	Indução de Sistemas Enzimáticos de Biotransformação	24
4.2.2	Estresse Oxidativo e Indutores/Inibidores de CYP1A1	25

4.3	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	25
4.3.1	Homogenato	25
4.3.2	Extrato Ácido	26
4.3.3	Fração Microsomal	26
4.4	ATIVIDADE DOS MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES	
4.4.1	Análise do Citocromo P4501A1	27
4.4.1.1	Concentração de Proteínas	27
4.4.1.2	Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase – EROD	27
4.4.1.3	Determinação da atividade do ácido glicurônico uridina difosfato transferase (UGT)	27
4.4.2	Avaliação da Lipoproxidação Tecidual (TBARS)	28
4.4.3	Defesas Antioxidantes enzimáticas	28
4.4.3.1	Catalase (CAT)	28
4.4.3.2	Glutathione Peroxidase (GPx)	29
4.4.3.3	Glutathione Redutase (GR)	29
4.4.3.4	Glutathione S-Transferase (GST)	29
4.4.3.5	Glicose 6-fosfato Desidrogenase (G6PDH)	30
4.4.4	Análise das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas	30
4.4.4.1	Glutathione Reduzida (GSH)	30
4.4.4.2	Glutathione Total (GT) e Glutathione Oxidada (GSSG)	30
4.4.5	Marcadores de Função Hepática	30
4.4.5.1	Determinação da Atividade da Aspartato Amino Transferase (AST/TGO)	31
4.4.5.2	Determinação da Atividade da Aspartato Amino Transferase (AST/TGO)	31
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
5	RESULTADOS	
	PARTE I – INDUÇÃO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO	
5.1	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ATIVIDADE DO CYP1A1	33

5.1.1	Atividade EROD dose-dependente	33
5.1.2	Atividade EROD tempo-dependente	34
5.2	Avaliação da indução da atividade da GST	35
5.2.1	Atividade GST dose-dependente	35
5.2.2	Atividade GST tempo-dependente	36
5.3	Avaliação da indução da atividade da UGT	38
5.3.1	Atividade UGT dose-dependente	38
5.3.2	Atividade UGT tempo-dependente	38
	PARTE II – ESTRESSE OXIDATIVO E INDUTORES/INIBIDORES DE CYP1A1	39
5.4	MEDIDAS DE CONCENTRAÇÃO DE TBARS	39
5.5	ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	40
5.5.1	Glutathione Redutase	40
5.5.2	Glutathione Peroxidase	41
5.5.3	Catalase	42
5.5.4	Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	43
5.6	ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	44
5.6.1	Glutathione Total; Glutathione reduzida e Glutathione Oxidada	44
5.7	MARCADORES DE FUNÇÃO HEPÁTICA	46
5.7.1	Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT)	46
6	DISCUSSÃO	48
6.1	ANTI-CHAGÁSICO (BZN)	48
6.2	ANTI-HELMÍNTICO (ABZ)	54
7	CONCLUSÕES	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	74

ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Estrutura química do fármaco anti-helmíntico ABZ	5
Figura 02	Estrutura química do fármaco tripanomicida BZN	7
Figura 03	Geração de ROS/RNS	9
Figura 04	Geração de hidroperóxidos de lipídios, propagação, ataque ao DNA, formação de adutos e geração de cromóforos	11
Figura 05	Defesas antioxidantes enzimáticas e geração de ERO	14
Figura 06	Os vários passos da biotransformação	16
Figura 07	Efetores e substratos do P450E1	19
Figura 08	Síntese do ácido UDP-glicurônico	21
Figura 09	Inibição de CYP1A1 e CYP1A2 por ANF	23
Figura 10	Atividade EROD dose-dependente	34
Figura 11	Atividade EROD tempo-dependente	35
Figura 12	Atividade da glutathione S-transferase dose-dependente	36
Figura 13	Atividade da glutathione S-transferase tempo-dependente	37
Figura 14	Atividade do UGT dose-dependente	38
Figura 15	Atividade da UGT tempo-dependente	39
Figura 16	Concentração de TBARS	40
Figura 17	Atividade da glutathione redutase	41
Figura 18	Atividade da glutathione peroxidase	42
Figura 19	Atividade da catalase	43
Figura 20	Atividade da glicose 6 fosfato desidrogenase	44
Figura 21	Atividade de glutathione total	45
Figura 22	Atividade de glutathione reduzida	45
Figura 23	Atividade de glutathione oxidada	46

Figura 23 Atividade AST e ALT

47

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Concentração de citocromo P450 em tecidos de
Mamíferos

18

LISTA DE ABREVIATURAS

ABZ	-	Albendazol
ABZSO	-	Albendazol Sulfoxido
ABZSO ₂	-	Albendazol Sulfona
ALT	-	Alanina Amino Transferase
ANF	-	α -naftoflavona
AST	-	Aspartato Amino Transferase
BNF	-	β -naftoflavona
BZN	-	Benzonidazol
CAT	-	Catalase
CYP450	-	Citocromo P450
ERO	-	Espécies Reativas de Oxigênio
EROD	-	Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase
FMO	-	Flavina Monoxigenase
G6PDH	-	Glicose 6-Fosfato Desidrogenase
GPx	-	Glutationa Peroxidase
GR	-	Glutationa Redutase
GSH	-	Glutationa Reduzida
GSSG	-	Glutationa Oxidada
GST	-	Glutationa S-Transferase
GT	-	Glutationa Total
H ₂ O ₂	-	Peróxido de Hidrogênio
HO [•]	-	Radical Hidroxil
O ₂ ^{•-}	-	Radical Ânion Superóxido
SOD	-	Superóxido Dismutase
TBARS	-	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
UDPGA	-	Ácido Glicurônico Uridina Difosfato
UGT	-	Ácido Glicurônico Uridina Difosfato Transferase

RESUMO

Alguns fármacos anti-parasitários como o antihelmíntico albendazol (ABZ) e o anti-chagásico benzonidazol (BZN), parecem exercer ação deletéria através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas através do processo de biotransformação, induzindo uma condição de estresse oxidativo nos parasitas. O ABZ é um derivado imidazólico antihelmíntico amplamente utilizado pelas populações de países sub-desenvolvidos. O BZN é um tripanomicida utilizado no tratamento da doença de Chagas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade destes fármacos via geração de ERO, por indução de sistemas enzimáticos de Fase I (CYP1A1) e Fase II (GST e UGT) do processo de biotransformação de fármacos, bem como o estresse oxidativo, associado a um indutor (β -naftoflavona, BNF) e a um inibidor (α -naftoflavona, ANF) do CYP1A1, em ratos machos Wistar tratados com diferentes concentrações de ABZ e BZN (10, 20 e 40mg/Kg de peso), durante diferentes períodos de tempo (2, 4, 10 e 30 dias). Após o tratamento, avaliou-se a atividade EROD, a atividade da GST e UGT; a medida das atividades enzimáticas da catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), além dos níveis de dano celular (TBARS) e os níveis dos tióis não-protéicos glutathione total (GT), glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG). Os resultados revelaram que o ABZ e BZN foram capazes de induzir a atividade do CYP1A1, o ABZ promoveu uma indução na atividade da GST e UGT. Já o BZN inibiu a atividade da GST e elevou a da UGT. Os níveis de TBARS permaneceram induzidos em todos os tratamentos realizados, incluindo a BNF, ANF, e os relacionados com os fármacos anti-parasitários. O perfil de algumas das enzimas antioxidantes e das defesas antioxidantes não-enzimáticas permite concluir que o BZN e ABZ são geradores de ERO possivelmente através da indução da isoforma CYP1A1, sendo que o tratamento com o inibidor deste sistema (ANF) foi capaz de reverter este processo.

Palavras-Chave: Benzonidazol, Albendazol, Indução do citocromo P450, Defesas Antioxidantes

ABSTRACT

The antihelminthic albendazol (ABZ) and the antichagasic benznidazol (BZN), seem to act through the deleterious generation of reactive oxygen species (ROS) elicited by the biotransformation process involved. ABZ is an imidazolic derivative that possess an antihelmintic effect, which is largely used in developing countries. BZN is currently the only tripanocide drug available for the treatment of Chagas' disease. Aiming the toxicity evaluation of both drugs via ROS generation, we studied the induction of Phase I (cytochrome P1A1 or CYP1A1), as well as the enzymes of Phase II (GST and UGT) belloning to biotransformation process of drugs and xenobiotics, as well as the oxidative stress associated to an inductor (β -naftoflavone, BNF) and an inhibitor (α -naftoflavone, ANF) of CYP1A1, in Wistar male rats treated with diferents ABZ and BZN concentrations (10, 20 and 40mg/Kg weight), during diferent periods of time (2, 4, 10 and 30 days). After treatment, the activities of EROD, GST, UGT, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), and the levels of TBARS and total glutathione (TG), reduced glutathione (GSH), and oxidized glutathione (GSSG) were determined. The results showed that ABZ and BZN were able to induce CYP1A1 activity, and that ABZ provoked a increase in UGT activity, while ABZ treatment provoked a slight increase in GST and UGT activities. TBARS contents increased after all treatments, including the treatment with BNF, ANF. From the results obtained from the antioxidant enzymes and from the contents of TBARS and GSH, we conclude that BZN and ABZ are ROS generators through the CYP1A1 isoform, and the treatment with an inhibitor of this system (ANF) reverted such process.

Key-words: Benznidazole, Albendazole, cytochrome P-450 inducer, Antioxidant defences

“Existe uma época da vida em que queremos conhecer tudo. Depois, achamos que sabemos tudo. Então, crescemos. E descobrimos que a constante busca do conhecimento faz parte da nossa vida. Como a busca dos nossos sonhos”.

Autor Desconhecido

1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias são comuns em todo o mundo. Embora algumas infestações não sejam perceptíveis, outras debilitam e até matam os hospedeiros. Atingem principalmente populações que vivem em condições sócio – econômicas muito baixas. Nestes locais geralmente o saneamento básico é precário, e é comum encontrarmos pessoas contaminadas por mono ou poliparasitoses (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1998; KOROLKOVAS, 1999).

A helmintíase é uma parasitose de distribuição cosmopolita, porém é encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Aparece com frequência em grande parte da população brasileira. O estudo desta parasitose é de grande importância, levando-se em consideração os problemas de saúde em nosso país (NEVES, 1984).

Outra parasitose de alta incidência em países tropicais é a doença de Chagas. Esta doença é endêmica na América do Sul, e estima-se que cerca de 16 a 18 milhões de pessoas são por elas afetadas, e que 50.000 morrem anualmente infectados por esta moléstia (GUEDES et al., 2002). No Brasil é principalmente encontrada no Rio de Janeiro, Mato Grosso, São Paulo, Goiás e estados do Norte. O maior problema do “chagásico”, manifestando ou não sintomatologia clínica, é apresentar sobrevida menor, ou muitas vezes redução da sua capacidade física (NEVES, 1984).

Os fármacos de escolha no tratamento das helmintíases e doença de Chagas são compostos imidazólicos, tais como o ABZ e o BZN. O ABZ, é um derivado benzimidazol e o BZN um derivado nitroimidazólico. O mecanismo de ação destes fármacos ainda não está bem definido, porém parece estar envolvido com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Segundo Asteinza et al. (2000) alguns destes fármacos são capazes de induzir o sistema de monoxidação citocromo P450 (CYP450), em especial a isoforma P4501A1.

Radical livre é qualquer átomo, grupo de átomos ou moléculas que possuem um par de elétrons não pareados, formados durante as reações biológicas. As ERO são as formas de maior interesse devido à sua alta reatividade (SIES, 1993). Estes radicais altamente reativos podem causar ruptura da fita de DNA, alquilação de proteínas e peroxidação lipídica (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O sistema enzimático CYP450, ácido glicurônico uridina difosfato transferase (UGT) e glutathione S-transferase (GST), enzimas da fase I e II de biotransformação, são os responsáveis pela metabolização da maioria dos fármacos. O principal objetivo da biotransformação é tornar os compostos suficientemente ionizáveis para viabilizar sua excreção, e iniciar a eliminação de um composto estranho ao organismo (BIDLACK; BROWN; MOHAN, 1986). No entanto, alguns compostos por mecanismo de bioativação, podem tornar-se mais tóxicos após serem biotransformados.

Tendo em vista a grande prevalência das doenças parasitárias em todo o mundo, principalmente em países tropicais como o Brasil, onde o uso de agentes antiparasitários é abusivo e indiscriminado, se faz necessário uma avaliação da capacidade destes fármacos gerarem radicais livres e, conseqüentemente, levarem à uma toxicidade para o hospedeiro.

Desta forma, a principal meta do presente trabalho consiste em avaliar a potencial toxicidade de dois antiparasitários, derivados imidazólicos, ABZ e BZN; já que parecem exercer suas ações através da formação de ERO e indução do CYP450, em especial a isoforma P4501A1, que tem sido freqüentemente associada à ativação de compostos mutagênicos e carcinogênicos (PEDROSA et al., 1998; PEDROSA et al., 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estresse oxidativo gerado pelos antiparasitários ABZ e BZN, e verificar a sua correlação com a indução de enzimas de fase I (CYP450) e fase II (UGT e GST) da biotransformação de fármacos em fígado de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a indução do CYP450, em especial a isoforma 1A1, no fígado de ratos tratados com ABZ e BZN.
- Verificar a indução da UGT e GST, no fígado de ratos tratados com ABZ e BZN.
- Verificar a indução do estresse oxidativo no fígado de ratos tratados com ABZ e BZN.
- Avaliar a participação do CYP450 no estresse oxidativo induzido por estes fármacos, através da exposição simultânea a antiparasitários e inibidor específico do CYP1A1, α -naftoflavona.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HELMINTOSES

Os helmintos são animais multicelulares que incluem cestodas, nematodas e trematodas. Existem dois tipos clinicamente importantes de infecções por helmintos: quando o verme se aloja no tubo digestivo do hospedeiro (*Taenia sollium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*), ou quando fica nos outros tecidos do hospedeiro (*Shistosoma mansoni*) (RANG; DALE; RITTER, 1997).

Os helmintos são aeróbicos facultativos, exibindo vários níveis de tolerância à deficiência de oxigênio, a maioria parasita o intestino e vive em um ambiente deficiente em oxigênio, sendo seu consumo estritamente dependente da tensão de oxigênio (DOCAMPO; MORENO, 1984). Devido à sua vida predominantemente anaeróbica *in vivo*, os helmintos são muito sensíveis às ERO (DOCAMPO, 1989).

3.2 DERIVADOS DO BENZOMIDAZOL

Os principais fármacos benzimidazóis utilizados terapeuticamente são o mebendazol, tiabendazol e ABZ (GOODMAN; LIMBIRD, 1996; VALDEZ et al., 2002). São antihelmínticos polivalentes, que exercem atividade vermícida, ovícida e larvívica (KOROLKOVAS, 1999).

Como os helmintos vivem em baixas tensões de oxigênio e não apresentam defesas antioxidantes apropriadas, alguns fármacos parecem exercer sua ação deletéria através da geração de ERO (LOCATELLI, 2001).

O albendazol (ABZ), [metil-(propiltio-1H-benzimidazol-2-il)-carbamato], é um antihelmíntico de amplo espectro (figura 1), usado com eficácia no tratamento da hidatidose e neurocisticercose (ASTEINZA et al., 2000), e também largamente

utilizado no tratamento de strongiloidíases, teníases, larva migrans cutânea e visceral (SILVA; GUYATT; BUNDY, 1997). Estudos recentes têm estabelecido que benzimidazóis como o ABZ e mebendazol inibem “in vitro” o crescimento de *T. vaginalis* e *G. lamblia* (VALDEZ et al., 2002).

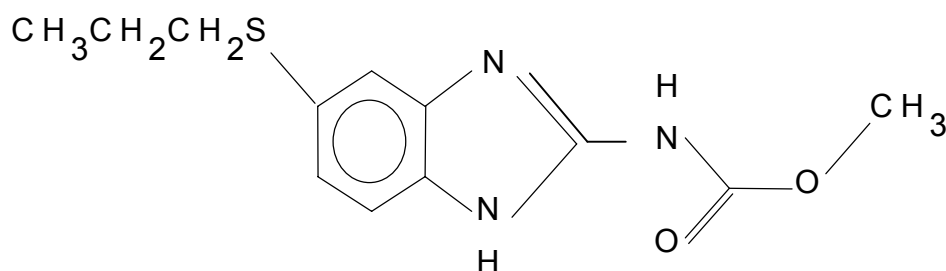


Figura 1: Estrutura química do fármaco antihelmíntico albendazol (KOROLKOVAS, 1999).

O ABZ administrado por via oral é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal (5%). É rapidamente biotransformado no fígado, e seu metabólito primário, ABZ sulfóxido (ABZSO), atinge uma concentração de 0,25 a 0,30 µg/ml cerca de 2,5 a 3 horas após administração de uma dose. A ligação do metabólito sulfóxido às proteínas plasmáticas é cerca de 70%, tendo meia-vida biológica de 8 a 9 horas, sendo excretado pela urina nas primeiras 24 horas (KOROLKOVAS, 1999).

O ABZ pode ser encontrado na forma de comprimidos de 200 e 400 mg ou de suspensão pediátrica de 2 e 4% (SILVA; GUYATT; BUNDY, 1997; KOROLKOVAS, 1999). Este fármaco responde bem às infecções maciças, porém nestes casos, doses altas e tratamento prolongado são requeridos (SILVA; GUYATT; BUNDY, 1997; VALDEZ et al., 2002). Para tratamento de giardíase é usada dose única diária de 400mg, durante 5 dias consecutivos (LACEY, 1990).

A biotransformação do ABZ em compostos ativos, envolve uma S-oxidação inicial por flavina monooxigenase (FMO) e CYP3A4, produzindo ABZSO, e uma segunda S-oxidação pela isoforma CYP1A1, produzindo ABZ sulfona (ABZSO₂) (ASTEINZA et al., 2000; KITZMAN; CHENG; FLECKENSTEIN, 2002). A atividade antihelmíntica e embriotóxica *in vivo* do ABZ é devido principalmente ao metabólito sulfóxido (GILLES, 1996; SILVA; GUYATT; BUNDY, 1997; ASTEINZA et al., 2000).

O ABZ é contra indicado para crianças menores de 2 anos, para mulheres grávidas e durante a lactação (KOROLKOVAS, 1999). Segundo Weiss (1993), a toxicidade induzida pelo fármaco pode ser dose - dependente e previsível. Este fármaco pode interromper a hematopoiese por vários mecanismos diretos ou por iniciar resposta imune anormal, afetando diferentes componentes da medula. Também foi observado que cães e gatos, após tratamento de giardíase com ABZ, apresentaram toxicidade medular (STOKOL et al., 1997).

3.3 DOENÇA DE CHAGAS

O protozoário flagelado *Trypanossoma cruzi* é o agente causal da doença de Chagas, manifestada na forma de cardiopatia potencialmente fatal ou dilatações do trato digestivo (OLIVEIRA et al., 1997). A transmissão primária da doença de Chagas é a vetorial, que ocorre através das fezes dos triatomídeos, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”. Estes insetos expelem junto com as fezes, algumas formas tripomastigotos e estas penetram pela ferida produzida pela picada (GWADZ; HOTEZ, 1995).

A doença de Chagas pode apresentar duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda os sintomas não são específicos, o que dificulta o diagnóstico. Porém é consenso de que ela dependa da virulência do parasita e da capacidade reativa do infectado (RASSI; NETO, 2000). Na fase crônica, o tecido geralmente mais afetado é o miocárdio (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1998).

3.4 COMPOSTOS NITROIMIDAZÓLICOS

Os compostos nitroimidazólicos são agentes tripanomicidas que manifestaram atividade em infecções humanas ou veterinárias (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1998). Os dois principais fármacos usados são o nifurtimox (NFX), atualmente fora do mercado brasileiro devido a sua elevada toxicidade, e o BZN. O objetivo do

tratamento é suprimir a parasitemia e, conseqüentemente, seus efeitos patogênicos ao organismo (KOROLKOVAS, 1999; DIAS, 1999).

Estes fármacos têm sido usados com sucesso no tratamento da fase aguda da doença, porém, em pacientes que manifestam a fase crônica, o tratamento ainda é ineficiente (GUEDES et al., 2002).

O benzonidazol (BZN), [2-nitro-N-(fenilmetil)-1 H-imidazol-1-acetamida] (figura 2), é o fármaco tripanomicida disponível no Brasil e na Argentina para o tratamento da doença de Chagas.

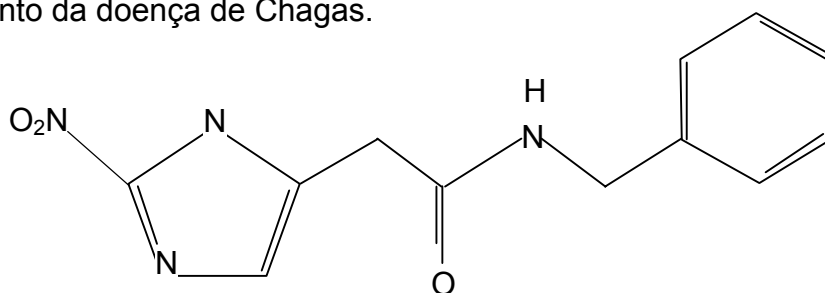


Figura 2: Estrutura química do fármaco tripanomicida BZN (KOROLKOVAS; BURCKHLTER, 1998).

O mecanismo de ação específica do BZN é pouco conhecido e há controvérsias na literatura quanto à sua ação sobre o *T. cruzi*. Foi proposto que a redução do grupo nitro constitui o principal passo para as propriedades tripanomicida e tóxica do BZN. A redução de um elétron resulta na formação de um radical nitroânion, e a re-oxidação resulta na formação de ERO. A redução do grupo nitro pode regular a formação de um composto nitroso instável e hidroxilamina intermediária, podendo levar a ruptura do DNA, alquilação de proteínas e peroxidação lipídica (PEDROSA et al., 2001).

O BZN é encontrado na forma de comprimidos de 100mg. Administrado por via oral, é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal. A ligação a proteínas plasmáticas é da ordem de 44%, e atinge concentrações plasmáticas máxima (2,22 a 2,81µg/ml) em 2 a 4 horas. Sua meia-vida é de aproximadamente 12 horas. A sua biotransformação é parcial, encontrando-se no organismo na forma inalterada e

biotransformada e é excretado como metabólito ou inalterado pela urina e fezes (KOROLKOVAS, 1999).

A toxicidade do BZN vem sendo comprovada em modelos experimentais. Em bactérias é mutagênico, induzindo pontos de mutação provavelmente por substituição das bases nitrogenadas (NAGEL, 1987; FERREIRA; SCHWARZ; FERREIRA, 1988). É tóxico para células de mamíferos em hipóxia (ZAHOOOR; LAFLEUR; KNIGHT, 1987) e para protozoários (GOIJMAN; FRASCH; STOPPANI, 1985).

O *T. cruzi* é deficiente em enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase, determinando assim, a atividade do fármaco sobre o parasita (SREIDER et al., 1990; GRIMBLAT; SREIDER; STOPPANI et al., 1990). Entretanto, a produção de ERO pode ocorrer tanto no *T. cruzi* quanto no hospedeiro, podendo então explicar em parte a toxicidade dos nitroderivados (STOPPANI, 1999).

3.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

O oxigênio é uma molécula essencial para todas as formas de vida aeróbica, todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma eficiente produção de energia (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999; HADDAD, 2002). O metabolismo do oxigênio nestes organismos aeróbicos, implica na formação de ERO. Este ERO podem oxidar moléculas biologicamente relevantes e produzir alterações em células e tecidos. Esta oxidação é funcionalmente minimizada por várias defesas antioxidantes presentes em todos os organismos aeróbios (WILHEM FILHO et al., 2000; HADDAD, 2002). A toxicidade do oxigênio é um fenômeno aparentemente contínuo e presente mesmo sob normóxia em organismos aeróbicos sadios dotados de diferentes e específicas defesas antioxidantes (WILHEM FILHO; GONZALEZ-FLECHA; BOVERIS et al., 1994).

As três espécies reativas de oxigênio mais importantes, são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\cdot}). São resultantes da redução parcial de O_2 e consequência da transferência de um, dois e

três elétrons respectivamente (Figura 3) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; WILHEM FILHO et al., 2000).

As ERO são altamente reativas, apesar da sua breve existência, possuem um certo instante de vida livre no qual procuram reagir com a matéria circundante e, assim, adquirir estabilidade (SIGNORINI; SIGNORINI, 1995). Ao reagir com biomoléculas, causam diferentes tipos de dano biológico, podendo levar à morte celular. A espécie que apresenta maior toxicidade é o radical hidroxil, que tem alta reatividade com os constituintes celulares (PUNCHARD; KELLY, 1996; WARD; TIMOTHY, 1997).

Recentemente foi demonstrado a interação entre $O_2^{\cdot-}$ e ácido nítrico (NO^{\cdot}), gerando peróxido nitrito ($ONOO^-$), que apesar de não se tratar de uma ERO, é uma espécie fortemente reativa que pode induzir a peroxidação lipídica e dano às proteínas (PUNCHARD; KELLY, 1996; LIMA; STOREY; STOREY, 1998).

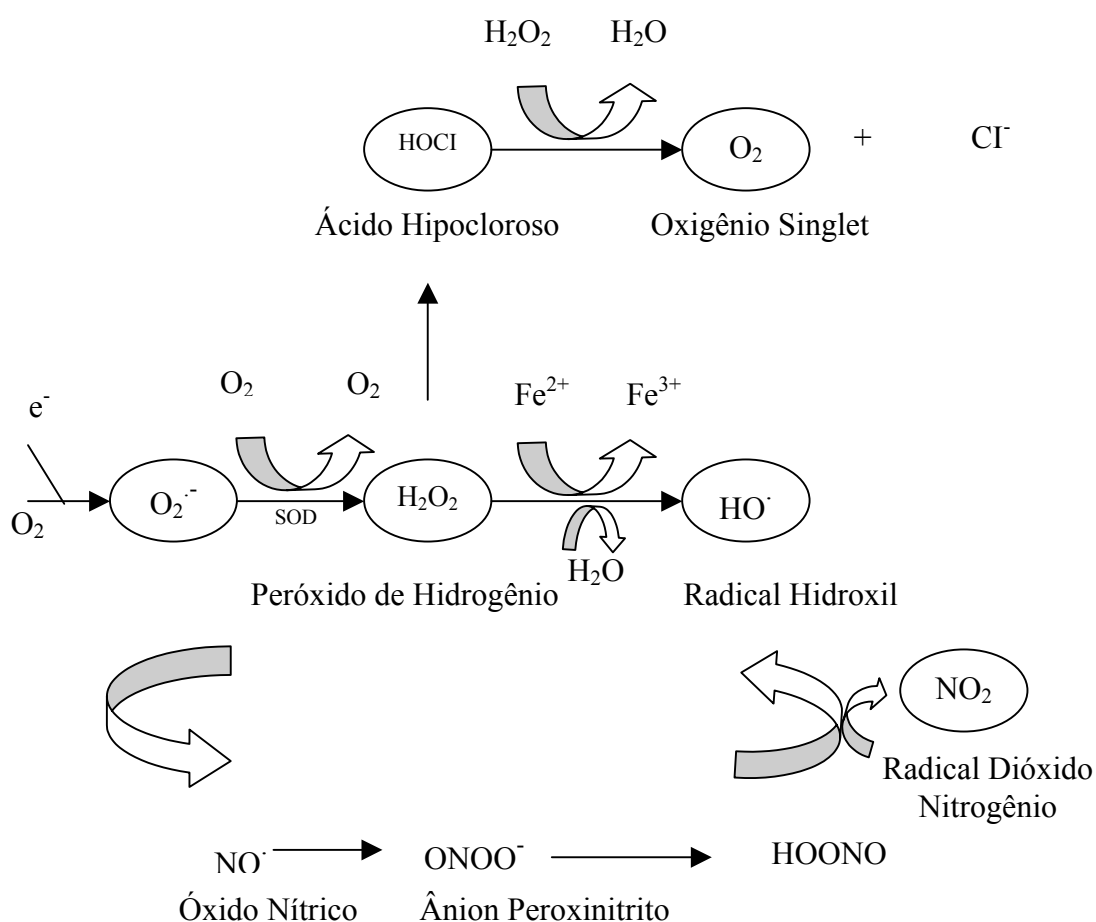


Figura 3: Esquema reacional para geração de ROS/RNS (HADAAD, 2002).

Estima-se que aproximadamente 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbicos, é reduzido de forma tetravalente até H_2O , na cadeia respiratória (CHANCE; SIENS; BOVERIS, 1979; WILHELM et al., 2000) através do citocromo c e oxidase mitocondrial, sem geração de ERO (FRIDOVICH, 1979). Mesmo assim, a formação do ânion superóxido estaria localizado principalmente na cadeia respiratória mitocondrial, correspondendo à cerca de 2% do oxigênio consumido (CHANCE; SIENS; BOVERIS, 1979; BOVERIS; CADENAS, 1982).

A produção de HO^\cdot intracelular a partir da reação do $O_2^{\cdot-}$ com o H_2O_2 na presença de metais de transição como ferro e cobre (Reação de Fenton) tem grande importância biológica devido à sua elevada reatividade (PYOR, 1986; WARD; TIMOTHY, 1997; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999).

Diversas são as patologias humanas relacionadas com as ERO, dentre elas destacam-se aquelas relacionadas com o sistema imunológico (onde as ERO possuem papel de defesa), aparelho cardiovascular, respiratório, neurológico e da visão, também em processos relacionados ao envelhecimento e carcinogênese (JI, 1993; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999).

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO X FÁRMACOS

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provocando uma variedade de mudanças fisiológicas (CROFT, 1998; HADDAD, 2002). Nestas situações as ERO podem estar aumentadas sem o concomitante aumento das defesas (AMSTAD; CERUTTI, 1990).

Através da formação de ERO, o estresse oxidativo pode causar oxidação de aminoácidos, alterar quimicamente as bases púricas e pirimídicas, quebrando a fita de DNA e provocar peroxidação lipídica (Figura 4) (WARD; TIMOTHY, 1997).

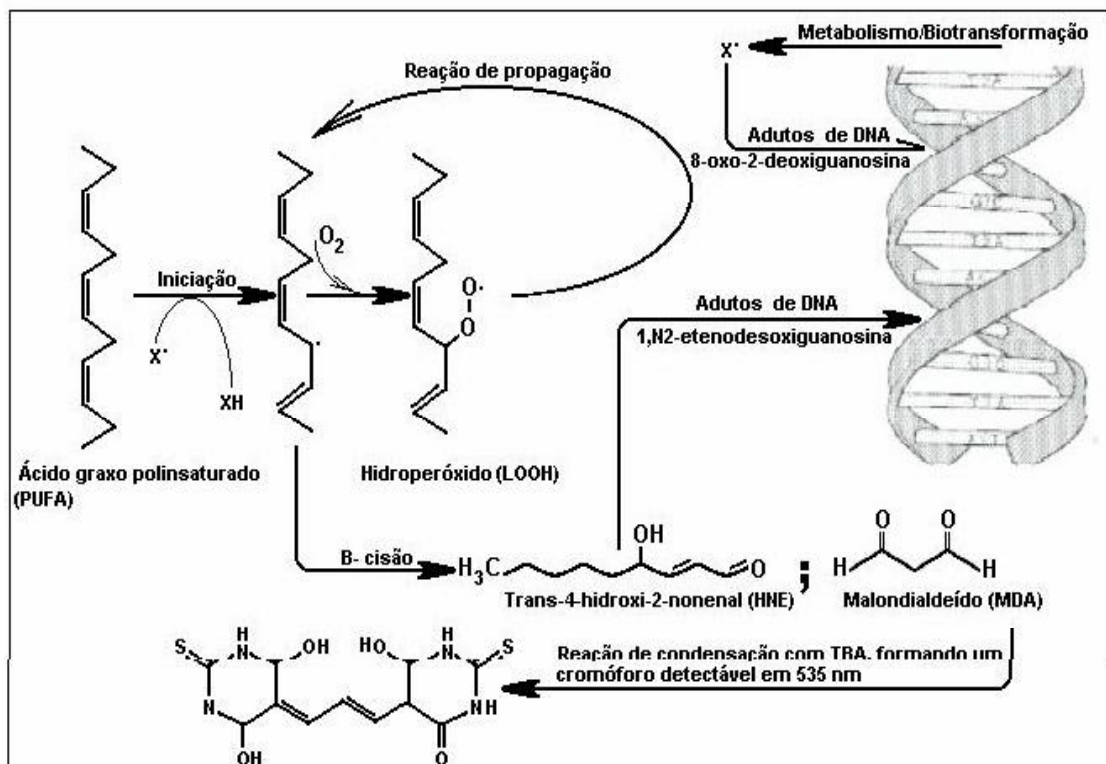


Figura 4: Geração de hidroperóxidos de lipídios, propagação, ataque ao DNA, formação de adutos e geração de cromóforos (DE BEM, 2001).

O dano celular associado ao estresse oxidativo pode ser induzido em organismos expostos a diferentes classes de substâncias químicas estranhas aos mesmos (VIDELA, GUERRI, 1990; DE GROOT; ANUNDI; SIES, 1991). Desta forma, a exposição constante dos seres vivos às substâncias químicas pode estabelecer processos mutagênicos e carcinogênicos (DI GIULIO et al., 1989).

Alguns anti-fúngicos imidazólicos, tais como cetoconazol, clotrimazol, miconazol, tem efeitos na expressão do CYP450 (LAVRIJSEN et al., 1986). Fármacos benzimidazóis, como o lansoprazol, omeprazol e o pantoprazol, apresentam a propriedade de induzir CYP1A1 e CYP1A2 em hepatócitos humanos (PEDROSA et al., 1994; MASUBUCHI; OKASAKI, 1997). Derivados imidazólicos como ABZ, mebendazol e BZN parecem induzir o sistema de oxidação mista, em especial a isoforma P4501A1, que tem sido freqüentemente associada à ativação de

compostos mutagênicos e carcinogênicos (PEDROSA et al., 1998; ASTEINZA et al., 2000; PEDROSA et al., 2001).

Segundo PEDROSA et al. (2001), a utilização de antihelmínticos em ratos determina uma situação de estresse oxidativo que pode ser acompanhada pelo monitoramento das enzimas CAT, GR, GPx, G6PDH e GST, da expressão do CYP450 e UGT, e dos níveis de antioxidantes não-enzimáticos como a glutathiona (GSH), além da análise do dano celular (TBARS).

Por outro lado, alguns trabalhos mostram a atenuação de morte celular programada induzida por estresse oxidativo e sua correlação com a exposição a indutores de CYP450, através da utilização de inibidores do CYP450, tais como a ANF, o 1-aminobenzotriazol e o SKF-525A (SHIBA, 1999).

3.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES

3.7.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

As principais enzimas que são essenciais para todos organismos aeróbicos na prevenção ou atenuação dos efeitos deletérios promovidos por ERO, são a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). É através delas que as células tentam manter baixas as quantidades do $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , para evitar a formação do HO^{\cdot} , que é extremamente danoso às células (Figura 5) (BOVERIS; CADENAS, 1997; WILHELM et al., 2000).

A SOD é considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das ERO. Está presente praticamente em todos os organismos eucarióticos e é responsável pela conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 (McCORD; RIDOVICH, 1969; PEDROSA et al., 2001; HADDAD, 2002).

Nos animais a CAT está presente em todos os órgãos vitais, especialmente no fígado e nos eritrócitos, com exceção das hemácias de algumas espécies de

peixes (WILHELM FILHO et al., 1996; WILHELM et al., 2000). O H_2O_2 originado pela dismutação do $\text{O}_2^{\cdot -}$ é convertido em H_2O e O_2 pela CAT nos peroxisomos e pela GPx no citoplasma (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HADDAD, 2002).

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água. Talvez a mais importante das peroxidases seja a GPx, enzima selênio-dependente, que utiliza o tripeptídeo tiólico glutathiona reduzida (GSH) como substrato para a decomposição de peróxidos orgânicos, tais como lipoperóxidos provenientes da peroxidação lipídica. Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutathiona, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GSSG) (KELLING; SMITH, 1982; LIMA; STOREY; STOREY, 1998).

Algumas enzimas como a glutathiona redutase (GR), auxiliam na manutenção do poder redutor intracelular. Esta enzima catalisa a redução da GSSG através da oxidação de NADPH, permitindo a contínua regeneração da GSH e da ação da GPx (LIMA; STOREY; STOREY, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A glutathiona S-transferase compreende uma família de enzimas capazes de detoxificar uma grande variedade de compostos, catalisando a sua conjugação com a GSH (SAGARA et al., 1998). Um aumento na atividade da GST poderia neutralizar os efeitos das ERO produzidas em processos de metabólitos endógenos ou de fontes exógenas.

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é a enzima responsável pela primeira reação oxidativa da via das pentoses, desidrogenação da glicose-6-fosfato a um éster intramolecular 6-fosfoglucona- δ -lactona. Esta reação tem como resultado final a formação da D-ribose-5-fosfato, com saldo de duas moléculas de NADPH (LEHNINGER; NELSON; COX 1993). Desta forma a G6PDH é responsável, em parte, pela manutenção do potencial redutor das células eucariotas. Esta enzima requer NADP como aceptor de hidrogênio (MURRAY et al., 2000).

O NADPH é uma piridina nucleotídeo envolvida em várias reações anabólicas e catabólicas. É o principal composto redutor intracelular, ou seja protege as células do dano oxidativo (ZHANG; STANTON, 2000). Este nucleotídeo é um dos principais responsáveis para a manutenção da atividade da GR (REED, 1986).

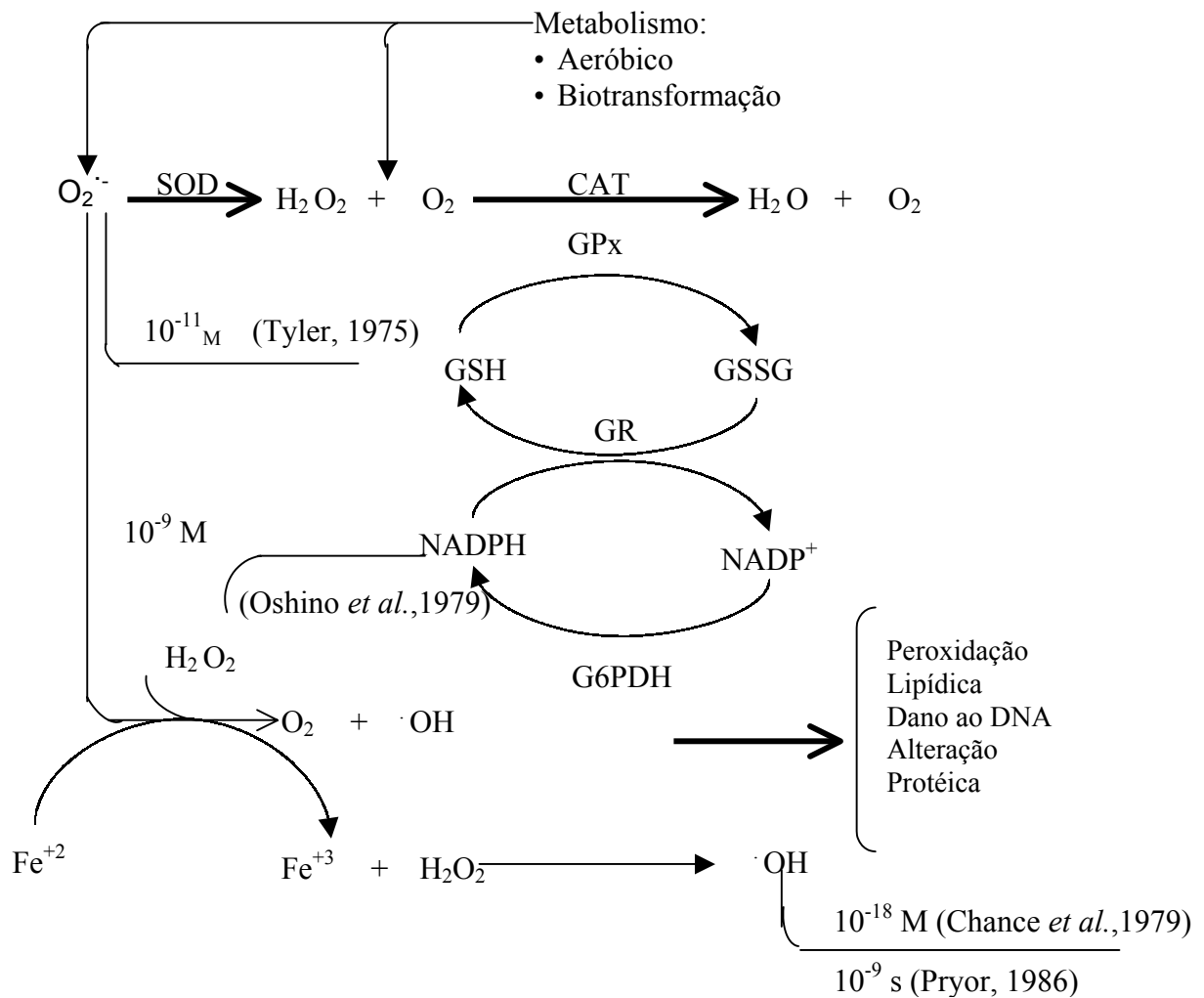


Figura 5: Interação das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de ERO e neutralização enzimática (DE BEM, 2001).

3.7.2 Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

Os mais importantes antioxidantes não-enzimáticos incluem, entre outros, compostos endógenos como a GSH, e outros antioxidantes exógenos como o tocoferol, ascorbato, carotenóides e flavonóides (LIMA; STOREY; STOREY, 1998; WILHELM FILHO *et al.*, 2000). Pode-se ainda destacar alguns hormônios, aminoácidos e pigmentos biliares (STOCKER *et al.*, 1990; WILHELM FILHO *et al.*, 2000).

A glutathione está presente na maioria das células animais e vegetais em concentrações relativamente elevadas. Este peptídeo é um dos mais importantes antioxidantes não-enzimáticos, e muitas vezes é considerado como a primeira linha de defesa devido à sua habilidade em continuar prontamente ser recuperada pelo ciclo da GSH (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999; WILHELM FILHO et al., 2000).

Algumas vitaminas lipossolúveis como as vitaminas A e E, o β -caroteno e o licopeno, conferem proteção às membranas celulares. O β -caroteno e o licopeno podem ser excelentes na eliminação de ERO e da energia oriunda do oxigênio singlete $^1\text{O}_2$, respectivamente (SIES, 1993). A principal atuação da vitamina E é a inibição das reações de propagação decorrentes das reações em cadeia envolvendo a peroxidação lipídica (KRINSKY, 1989; SIES, 1993).

3.8 BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS

Os fármacos geralmente são compostos lipofílicos, com tendência a acumular-se no organismo. Para que este acúmulo não aconteça, estes devem tornar-se compostos suficientemente hidrossolúveis para serem eliminados (NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996). Este processo consiste na modificação química dos xenobióticos dentro do organismo, utilizando sistemas enzimáticos do metabolismo basal. O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação (HODGSON; LEVI, 1994). Os principais sistemas enzimáticos envolvidos na fase I e II de biotransformação são o CYP450, GST e UGT (LEWIS, 1996; WINZER; VAN NOORDEN; KOHLER, 2002).

Existem vários sistemas enzimáticos envolvidos no processo de biotransformação de xenobióticos (figura 6). As reações de biotransformação podem ser divididas em reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise), com introdução de um grupo polar à molécula, aumentando sua reatividade química; e reações de fase II, onde os compostos modificados pelas reações de fase I, são conjugados com moléculas endógenas que aumentam a polaridade dos fármacos e facilitam sua excreção (HODGSON; LEVI, 1994; NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996).

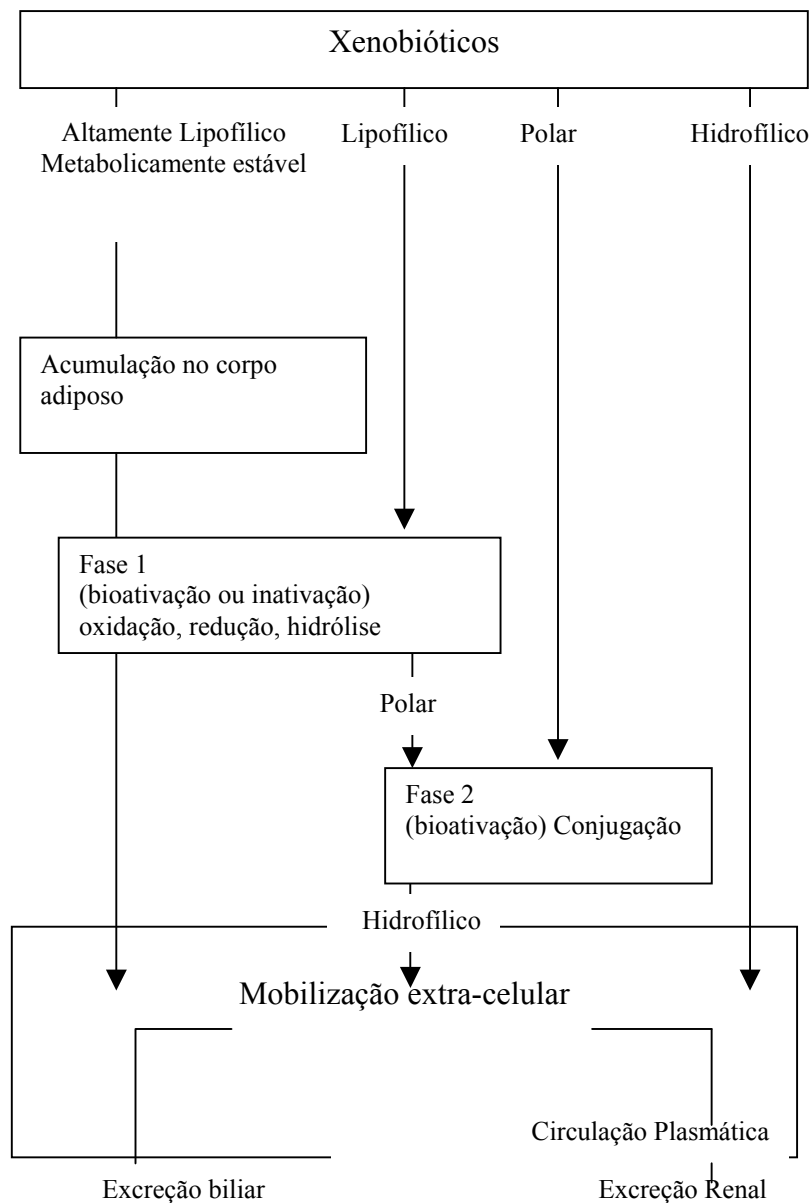


Figura 6: Esquema geral da biotransformação de xenobióticos com diferentes características de solubilidade (NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996).

Uma das reações mais importantes da fase I é a oxidação microsossomal, realizada por enzimas não específicas, como o CYP450 e ou pela FMO. A oxidação microsossomal consiste na redução de um átomo de oxigênio molecular à água, e o segundo oxigênio é incorporado ao substrato. O substrato se ligará ao CYP450 oxidado, reduzindo um elétron, através da enzima NADPH citocromo P450 redutase, resultando num complexo substrato-citocromo P450 reduzido (HODGSON; LEVI, 1994; NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996).

Entre as reações de fase II, a formação de glicoronídeos é quantitativamente a mais importante. A conjugação com o ácido glicurônico é o destino da maior parte dos compostos lipofílicos em células animais; este processo é mediado pela família do ácido glicurônico uridina difosfato transferase (UGT). Esta enzima catalisa a transferência do ácido glicurônico para o ácido glicurônico uridina difosfato (UDPGA), um extenso acceptor de moléculas (MEECH; MACKENZIE, 1997).

3.8.1 Citocromo P450

O nome deste sistema enzimático é derivado da habilidade de ligação com o monóxido de carbono na forma reduzida e absorção máxima do complexo a 450 nm. O CYP450 é uma hemoproteína, com Fe-protoporfirina IX. Esta estrutura permite mudanças conformacionais para a exposição do sítio ativo para a ligação do substrato (GUENGERICH, 1992; LEWIS, 1996). O CYP450 tem papel importante na ativação e detoxificação de numerosos fármacos, outros compostos externos e substâncias endógenas (CHANG, GONZALES; WAXMAN, 1994).

O CYP450 foi descoberto em preparações de microsomos hepáticos de mamíferos, e posteriormente foi observado em muitos órgãos e tecidos de vários outros animais vertebrados. Sabe-se porém, que em mamíferos ele está predominantemente no retículo endoplasmático de células hepáticas, mas pode também ser encontrado no rim, pulmão, pâncreas, trato gastrointestinal entre outros (Tabela 1) (SAVENI-CHAPEL; BAST; NOORDHOEK, 1982; LEWIS, 1996). A diferença entre as isoenzimas de várias espécies pode ser pequena. Em alguns casos, somente um aminoácido está substituído, enquanto em outros uma larga sequência de aminoácidos pode ser diferente (NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996).

TABELA 1- Concentração de CYP450 em vários tecidos de mamíferos
Espécies de Mamíferos

Órgão	Rato	Camundongo	Coelho	Porco da Índia	Homem
Fígado	0,22-0,92	0,39-1,10	0,81-1,70	0,43-1,45	0,26-1,02
Rim	0,05-0,21	0,40	0,14-0,36	0,32	0,03
Pulmão	0,035	-	0,27-0,38	0,07	-
Intestino	0,02-0,13	0,04	0,07-0,43	0,18	-
Glândula Adrenal	0,5	-	1,20	2,0	0,23-0,54
Testículo	0,05-0,10	0,24	0,04	0,078	0,005
Pele	0,05	0,022	-	-	-
Baço	0,025	-	-	-	-
Ovário	-	-	0,06	-	-
Cérebro	0,025-0,051	-	-	-	-

Fonte: LEWIS (1996).

Atualmente existem mais de 36 famílias e subfamílias de CYP450, baseadas na homologia da seqüência de aminoácidos. As famílias 1, 2, 3 e 4 são as principais envolvidas na biotransformação de xenobióticos, enquanto as outras famílias estão envolvidas no metabolismo de moléculas endógenas. A família CYP1A1 ainda não tem seu papel totalmente esclarecido. Porém, sabe-se que o CYP1A1 tem papel no centro regulatório da informação genética, devido à complementaridade estrutural do seu substrato constituído por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) com a região XRE do DNA (LEWIS, 1996).

O CYP1A1 foi uma das isoformas mais estudadas na década de 80 devido ao seu potencial de ativação de compostos pró-carcinogênicos. Um número de poluentes ambientais são substratos desta enzima, e, ocasionalmente, a

biotransformação pode formar produtos mutagênicos reativos (WEI et al., 2000; WINZER; VAN NOORDEN; KOHLER 2002).

A família CYP2E está envolvida com a detoxificação oxidativa de fármacos e outras espécies químicas em animais. Esta família é diferente das demais, sendo específica para pequenos substratos que são oxigenados com dificuldade, como a acetona, éter, etanol e benzeno (figura 7). Acredita-se que este substrato “estabiliza” o CYP2E1, e deste modo, o oxigênio ativado e aquele substrato são subsequentemente oxigenados pela produção de ERO, resultando em estresse oxidativo (LEWIS, 1996).

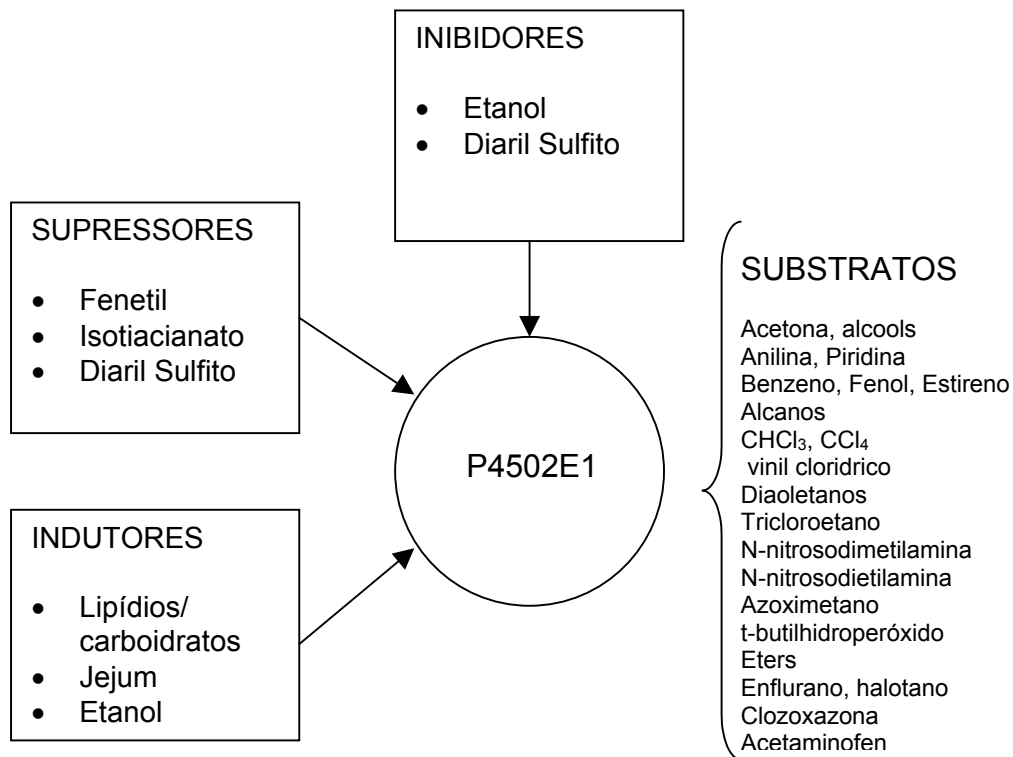


Figura 7: Efetores e substratos do P4502E1 (YANG; BRADY; HONG, 1992).

Fármacos usados no tratamento da tuberculose, como a isoniazida, podem causar hepatotoxicidade quando administradas com acetaminofen por indução do CYP2E1, já que esta enzima catalisa a formação do metabólico hepatotóxico do acetaminofen (ASTEINZA et al., 2000).

3.8.2 Ácido Glicurônico Uridina Difosfato Transferase (UGT)

A glicuronidação é a principal forma de conjugação em todos os vertebrados. Este processo altera as atividades fisiológica e farmacológica dos compostos, gerando produtos mais polares, para que possam ser eliminados pela bile ou urina (MEECH; MACKENZIE, 1997).

Estas reações são catalisadas por uma família de isoenzimas ligadas à membrana, as UGTs. Elas estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático do fígado, e, em menor extensão em todos os outros tecidos de mamíferos. Possuem um importante papel citoprotetor, por prevenir o acúmulo de xenobióticos potencialmente tóxicos ou evitando sua subsequente bioativação para intermediários reativos mais tóxicos (GRANCHAROV et al., 2001). Há uma ampla variedade de compostos endógenos e exógenos que são glicuronizados, incluindo a bilirrubina, hormônios esteróides, ácidos biliares e fármacos (MEECH; MACKENZIE, 1997).

A conjugação de um substrato contendo um grupo apolar com ácido glicurônico pode ocorrer somente depois do ácido glicurônico ser ativado. O ácido glicurônico ativado corresponde a ácido glicurônico uridina difosfato (UDPGA), o qual é formado por reações enzimáticas (figura 8). A UDPGA pode servir como substrato endógeno para a enzima ácido glicurônico uridina difosfato transferase (UGT), que catalisa a conjugação entre o xenobiótico com um grupo apolar e o ácido glicurônico (NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996).

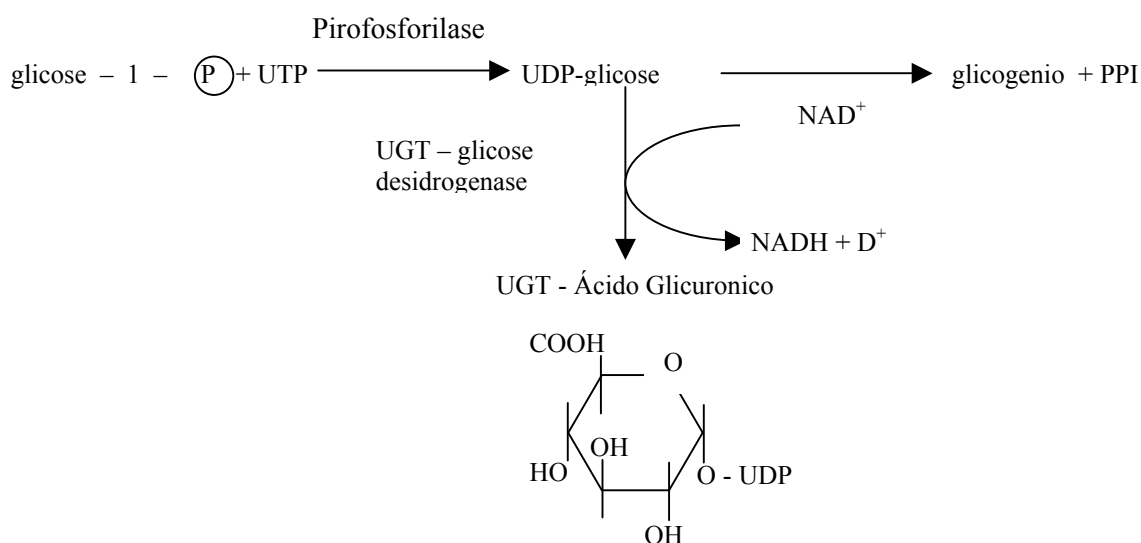


Figura 8: Síntese do ácido UDP-glicurônico (NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996).

A atividade dos xenobióticos é geralmente diminuída pela conjugação através do aumento da sua solubilidade, pelas reações com grupos hidroxilas (^-OH) e grupos aminas ($^-\text{NH}_2$) (HODGSON; LEVI, 1994; NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996). Porém, alguns compostos oriundos da fase I de biotransformação apresentam-se ainda mais ativos, após serem glicuronizados. Um exemplo é a morfina-6-glicuronide, que é um analgésico mais potente que a morfina (MEECH; MACKENZIE, 1997).

Desta forma, Grancharov e colaboradores (2001), discutem o papel das UGTs no sentido de esclarecer a recente concepção da carcinogênese, visto que os glicuronides podem ser uma forma de transporte de carcinogênicos.

Há evidências de que muitas substâncias endógenas, incluindo ácidos biliares, hormônios, acetil-coenzima A e nucleotídeos, inibem ou regulam a atividade da UGT (GRANCHAROV et al., 2001).

As reações da chamada fase II utilizam várias enzimas similares para catalisar as reações de conjugação, como as UGTs e as de conjugação da glutatona, com o xenobiótico (KERBOEUF et al., 1999).

3.9 INDUTORES E INIBIDORES DO CYP4501A

O CYP1A1 é fortemente induzido por compostos aromáticos policíclicos (PAH). Isto ocorre através da ligação a um receptor citoplasmático (Ah), resultando em uma ativação conformacional, podendo levar a alterações na afinidade de outros compostos como as proteínas estressoras (HSPs). O receptor Ah migra para o núcleo e interage com uma região específica do gene, o elemento responsivo Ah (ARE), resultando em uma transcrição localizada no locus Ah, incluindo algumas isoenzimas do P450, como a isoforma 1A1 e 1A2 (NERBERT; GONZALES, 1987; YANG, BRADY, HONG, 1992; WEI et al., 2000).

Assim como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os compostos carcinogênicos 3-metilcolantreno e β -naftoflavona também são indutores específicos da isoforma 1A1 (DENISON; WHITLOCK, 1995).

Derivados imidazólicos como ABZ, mebendazol e BZN também são capazes de induzir o CYP1A em ratos (PEDROSA et al., 1998; ASTEINZA et al., 2000). A administração intraperitoneal de ABZ em ratos causa a indução da atividade hepática do CYP1A1 associado à etoxiresurufina O⁻ deetilase (EROD) (ASTEINZA et al., 2000). Outros fármacos como o omeprazol, pantoprazol e lansoprazol, também possuem a propriedade de induzir o CYP1A1 e 1A2 em hepatócitos humanos (PEDROSA et al., 1994; MASUBUCHI; OKASAKI, 1997).

Inibidores químicos seletivos podem ser ferramentas importantes na elucidação da participação de uma enzima particular do sistema CYP450. Estes inibidores podem levar a reversibilidade total (competitivo), reversibilidade moderada e irreversibilidade (inibidores suicidas) da inibição do CYP450 (MIRANDA; HENDERSON; BUHLER, 1997). Esta inibição pode ocorrer de vários modos: alguns compostos podem se ligar ao sítio ativo na região da apoproteína do CYP450, onde este substrato será convertido pela isoenzima do CYP450, indo ocupar o mesmo sítio de ligação desta isoenzima, e podendo competir com um outro. Outros podem ser convertidos por metabólicos intermediários, e, desta maneira, podem formar complexos com CYP450, levando à inativação da enzima (NIESINK; VRIES; HOLLINGER, 1996).

A α -naftoflavona (ANF), um composto aromático contendo um grupo de anel benzoflavona (LEWIS, 1996), está frequentemente envolvido na investigação dos mecanismos de inibição do CYP1A1 (BACHMANN et al., 1993; CHANG; GONZALEZ; WAXMAN, 1994; MIRANDA; HENDERSON; BUHLER, 1997; SANDERINK et al., 1997). Estudos *in vitro* com hepatócitos humanos demonstraram potente inibição das enzimas do CYP1A1 e 1A2 pela ANF. A ANF inibe, desta maneira, a atividade da fenacetina O-deetilase e cafeína 3-dimetilase, enzimas CYP1A, seletivas em microsomas de fígado humano. Tanto o CYP1A1 quanto o CYP1A2 são igualmente sensíveis à inibição pelo ANF como mostra a figura 9.

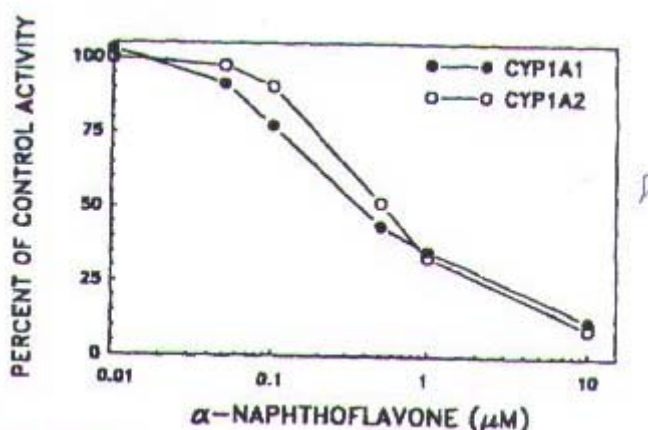


Figura 9: Inibição de CYP1A1 e CYP1A2 por ANF (CHANG; GONZALEZ; WAXMAN, 1994).

Antimicóticos imidazólicos como o cetoconazol, miconazol e clotrimazol também são muito efetivos na inibição do CYP1A1. Este alto poder de inibição do cetoconazol e compostos relacionados, é provavelmente explicado pela sua habilidade de ligação a ambos domínios lipofílicos e ao grupo heme do CYP450 (MIRANDA; HENDERSON; BUHLER, 1997).

Considerando que os fármacos imidazólicos ABZ e BZN sejam possíveis indutores do CYP450 e em especial a sub-família 1A1, que esta associada à produção de radicais livres, responsáveis pelo estresse oxidativo, o presente trabalho avaliou o estresse oxidativo dos animais submetidos ao tratamento com estes fármacos e a possível inibição deste estresse pela ANF.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para avaliar o estresse oxidativo, a indução e/ou inibição do CYP1A1, UGT e GST por fármacos (ABZ e BZN) foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, de aproximadamente 60 dias, não tratados com fármacos anti-parasitários, pesando 200 ± 50 g., provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram pesados e distribuídos em grupos de 6, permanecendo no laboratório de experimentação por um período de adaptação de 10 dias antes da realização dos experimentos, em gaiolas plásticas, mantidos à temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ$ C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial Nuvilab CR 1 e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais *in vivo* seguiram os princípios éticos na experimentação animal, tendo sido aprovado pela comissão de ética no uso de animais - CEUA-UFSC, sob número de cadastro 147/CEUA e protocolo 23080.007332/2002-48 conforme parecer em anexo.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1 Tratamento dos animais: Indução de Sistemas Enzimáticos de Biotransformação

ABZ [metil-(5-propiltio-1H-benzimidazol-2-il)-carbamato] e BZN [2-nitro-N-(fenilmetil)-1 H-imidazol-1-acetamida] foram dissolvidos em água em uma concentração de 20mg/ml. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com doses de 10, 20 e 40mg/Kg de peso durante 4 dias. Baseado neste ensaio preliminar, a dose de 40mg/Kg de peso foi selecionada para a investigação do

estudo tempo-dependente (2, 4, 10 e 30 dias). O grupo controle foi tratado com água destilada. No final dos tratamentos, os animais foram pesados, sacrificados por deslocamento cervical, seus fígados reperfundidos com salina 0,9%, retirados e pesados, e imediatamente divididos em 3 alíquotas: uma para produção de extratos ácidos, uma para produção de homogenatos de pH 7,4 e outra para preparação de microsossomos.

4.2.2 Estresse Oxidativo e Indutores/Inibidores de CYP1A1

Para avaliar a indução da atividade do CYP450, foi feito um primeiro grupo controle positivo cujos animais foram tratados com BNF (um indutor específico da isoforma 1A1), 100mg/Kg de peso, dissolvida em metilcelulose 1%, administrado por via oral, durante 3 dias. Um segundo grupo de animais foi tratado com ANF (um inibidor da isoforma 1A1), 250mg/Kg de peso, dissolvida em metilcelulose 1%, administrado via oral, e sacrificados após 4 horas de tratamento; o terceiro grupo foi tratado com antiparasitários ABZ ou BZN 40mg/Kg de peso, administrado via intraperitoneal e sacrificados após 4 dias de tratamento e um quarto grupo tratado com ABZ ou BZN 40mg/Kg de peso, via intraperitoneal, durante 4 dias, e ANF 250mg/Kg de peso, administrado via oral e sacrificado após 4 horas do tratamento. Amostras de sangue foram coletadas via punção ocular para determinação das atividades enzimáticas aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT).

4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.3.1 Homogenato

Os fígados dos animais foram retirados e colocados imediatamente em gelo. Uma pequena porção foi separada e pesada para a preparação dos homogenatos, obtidos em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100 e

150 mM de cloreto de sódio (1:20 p/v). A homogenização foi realizada a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos. Os sobrenatantes foram mantidos a -20°C até a sua utilização para as diferentes análises enzimáticas (CAT, GR, GPx, GST e G6PDH), bem como do dano celular (TBARS), através de espectrofotometria.

4.3.2 Extrato Ácido

Porções do fígado foram precipitadas com ácido tricloroacético 12% (1:20p/v) e homogenizadas com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos. Imediatamente após foi realizada a determinação dos tióis não-proteicos (GSH, GT e GSSG) nestes sobrenatantes.

4.3.3 Fração Microsomal

Os microsossomos foram preparados pelo método proposto por Schenkman e Cinti (1978), onde os fígados foram rapidamente removidos e homogenizados numa concentração de 16,7% com tampão Tris-sacarose 10mM pH 7,4 e centrifugados em centrífuga refrigerada, a 4°C a 600g durante 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 12.000g durante 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi precipitado com CaCl_2 8mM, e, em seguida, centrifugado a 25.000g durante 15 minutos. O precipitado foi lavado com KCl 15mM/Tris 10mM pH 7,4 e centrifugado a 25.000g por 15 minutos. A fração microsomal assim obtida foi ressuspensa com tampão de conservação glicerol. Os microsossomos foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido (-170°C) para posterior determinação da atividade EROD e UGT, enquanto outras amostras foram separadas para dosagem de proteínas.

4.4 ATIVIDADE DOS MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES

4.4.1 Análise do Citocromo P4501A1

4.4.1.1 Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas foi mensurada pelo método descrito por Lowry et al. (1951), com modificações, utilizando como padrão albumina bovina.

4.4.1.2 Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase – EROD

A atividade da 7-etoxiresorufina-O-deetilase, corresponde à atividade do CYP1A1 no fígado de ratos, foi medida por espectrofluorimetria em preparações microssomais. O substrato etoxiresorufina, 3,8mM foi incubado com microssomas (1mg proteína/ml) a 35°C na presença de NADPH em pH 7,8, 40mM o produto formado foi determinado fluorimetricamente. A resorufina foi utilizada com padrão interno para cálculo do coeficiente de extinção molar (Prough et al. 1978).

4.4.1.3 Determinação da atividade do ácido glicurônico uridina difosfato transferase (UGT)

Para determinação da UGT utilizou-se o método de Koivusaari (1983), com algumas modificações. A amostra (0,3mg de proteína), foi adicionada em uma mistura de pNP 0,53 mM, UDPGA 6,9 mM e tampão fosfato-Na 0,1M pH 7, incubadas durante 20min a 25°C. A reação foi interrompida com TCA 3% e a amostra centrifugada a 4000g durante 15 min. Ao sobrenadante e adicionou-se

NaOH 5M, medindo a absorbância em 400nm. A atividade da enzima foi avaliada em termos de consumo de pNP conjugado a UDPGA. Os valores foram expressos em consumo de pNP/min/mg proteína.

4.4.2 Avaliação da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, através da detecção em 535 nm, dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (Bird; Draper, 1984). Os homogenatos foram precipitados com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitados vigorosamente. Em seguida foram incubados em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73%, durante 60 minutos a 100°C. Após, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C e centrifugados (5min a 10000g), e a absorbância do cromóforo medido em 535nm, sendo os valores expressos em TBARS nmol g⁻¹.

4.4.3 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

4.4.3.1 Catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima, utilizou-se o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm durante 20 segundos, pela enzima presente na amostra. Utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. As amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em mmol min⁻¹ g⁻¹

4.4.3.2 Glutationa Peroxidase (GPx)

A GPx metaboliza o t-BuOOH gerando uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-SG), que, por sua vez, volta ao estado reduzido (2 GSH), pela ação da GR. A GR age mediante a oxidação de NADPH, assim o ensaio é uma medida indireta da redução do NADPH. Para este ensaio, segundo Flohé e Gunzler (1984), utilizou-se amostra e ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH) 10mM colocados em meio de reação composto de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, NADPH 1mM, ácido dietilenotriaminopentaacético (DPTA) 0,5 mM, pH 7,0, água destilada, GSH 10mM, e 5U de GR colocada momentos antes do ensaio. Este ensaio baseia-se na medida do decréscimo de absorbância (340 nm) promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir da GSH em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

4.4.3.3 Glutationa Redutase (GR)

O método utilizado para a análise da atividade desta enzima foi proposto por Carlberg e Mannervick (1985), onde se verifica, durante 30 segundos, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à redução da GSSG pela GR presente na amostra, em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, NADPH 1mM, GSSG e DPTA 0,5mM. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em $(\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1})$.

4.4.3.4 Glutationa S-Transferase (GST)

A atividade da glutatona S-transferase foi medida espectrofotometricamente em 340 nm, de acordo com Keen et al. (1974). A amostra foi adicionada em um meio

contendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), glutationa reduzida 0,1 M (GSH) e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, contra um branco de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressas em $\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

4.4.3.5 Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi medida espectrofotometricamente em 340 nm, de acordo com método de Glock e McLean (1953). O homogenato da amostra foi adicionado a uma cubeta contendo tampão fosfato 50mM pH 7,2, EDTA 0,5mM, MgSO_4 5mM, NADP^+ 0,2mM, usada como branco da amostra. Em seguida acrescentou-se a cubeta glicose 6-fosfato 2mM e fez-se a leitura do NADPH gerado. Os valores foram expressos em $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ tecido.

4.4.4 Análise das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

4.4.4.1 Glutationa Reduzida (GSH)

Para avaliar a concentração hepática de pequenos tióis em precipitado ácido, foi empregado o método de Beutler et al. (1963). A adição de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo tampão Tris-HCL 0.2 M pH 8,0 e amostra, permitia, após cerca de 3 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, mensurável em 412 nm. As concentrações obtidas neste ensaio foram expressas em mM.

4.4.4.2 Glutationa Total (GT) e Glutationa Oxidada (GSSG)

Para esta análise utilizou-se o método enzimático de Tietze (1969), onde a taxa de oxidação do NADPH usada na redução da GSSG e catalisada pela GR,

permitia avaliar indiretamente a concentração da glutatona total presente na amostra. As concentrações obtidas neste ensaio foram igualmente expressas em mM. Os valores de GSSG foram calculados em equivalentes ($2\text{GSH} = \text{GSSG}$), a partir da concentração da glutatona total.

4.4.5 Marcadores De Função Hepática

4.4.5.1 Determinação da atividade da alanina amino transferase (ALT/TGP)

Para determinação desta enzima foi utilizado kit comercial para diagnóstico clínico (LABTEST), segundo Reitman e Frankel (1957). Foi adicionado 0,25ml de TGP em tubo de ensaio, colocou-se em banho a 37°C durante 2 min, foi adicionado 0,05ml de sangue e incubada novamente a 37°C durante 30 min. Posteriormente adicionado 0,25ml do reagente de cor (temperatura ambiente durante 20min) e 0,25ml de NaOH. Determinou-se as absorbâncias em 505nm. Os valores foram expressos em U/l.

4.4.5.2 Determinação da atividade da aspartato amino transferase (AST/TGO)

Para determinação desta enzima foi utilizado kit comercial para diagnóstico clínico (LABTEST), segundo Reitman e Frankel (1957). Foi adicionado 0,25ml de TGO em tubo de ensaio, colocou-se em banho a 37°C durante 2 min, foi adicionado 0,05ml de sangue e incubada novamente a 37°C durante 60 min. Posteriormente adicionado 0,25ml do reagente de cor (temperatura ambiente durante 20min) e 0,25ml de NaOH. Determinou-se as absorbâncias em 505nm. Os valores foram expressos em U/l.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análises de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer, quando necessário. Para tal utilizou-se o software INSTAT (GrahPad, San Diego, CA, USA) admitindo níveis de significância de $p < 0,05$; $p < 0,01$; e $p < 0,001$.

5 RESULTADOS

PARTE I – INDUÇÃO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ATIVIDADE DO CYP1A1

5.1.1 Atividade EROD dose-dependente

Para avaliar os efeitos do ABZ e do BZN na atividade enzimática do CYP1A1 hepático, bem como estabelecer os níveis de exposição aos fármacos, um estudo de múltiplas doses foi realizado. Ratos foram tratados com doses crescentes de ABZ ou de BZN durante 4 dias e uma relação dose-resposta para atividade EROD foi determinada. A figura 10 mostra um crescente aumento da atividade EROD nos microsomas de fígados de ratos tratados com BNF, um indutor específico do CYP1A1. De forma semelhante, ABZ e BZN também demonstraram níveis significativamente elevados da atividade EROD em baixas concentrações, como 10 mg/Kg peso. Quando comparados com os controles, os animais tratados com ABZ e de BZN apresentaram atividade EROD aproximadamente 4 a 6 vezes maiores, respectivamente.

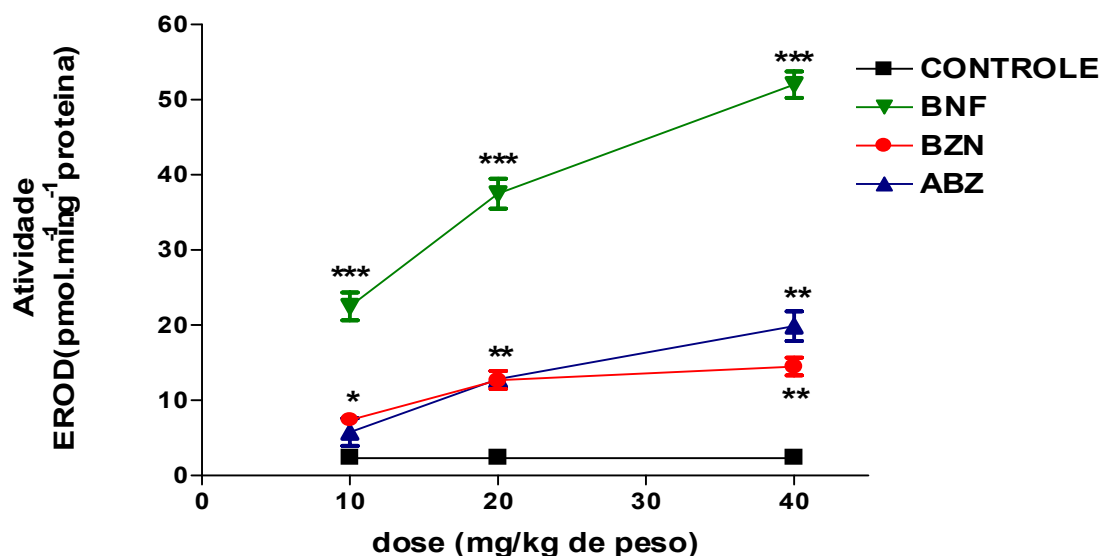


Figura 10: Atividade EROD ($\text{pmol min}^{-1} \text{ mg g}^{-1}$ de proteína) de microsomas de fígado de ratos tratados com 10, 20 e 40 mg/Kg de peso de BZN, ABZ, BNF e controles. (***) demonstra diferenças significativas ($p < 0,001$), (**) demonstra diferenças significativas ($p < 0,01$) e (*) demonstra diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n=6$.

Baseado neste estudo preliminar com múltiplas doses, e por localizar-se em faixa de doses utilizadas terapeuticamente a dose de 40mg/Kg peso foi selecionada para as investigações posteriores em um estudo tempo-dependente.

5.1.2 Atividade EROD tempo-dependente

A atividade da EROD mostrou-se aproximadamente 4 a 6 vezes maior nos animais tratados com ABZ e BZN, respectivamente, em 4 dias de tratamento em relação ao grupo controle (Figura 11). Este aumento da atividade do CYP1A1 foi observado nos animais tratados com ABZ até 10 dias e, posteriormente, observou-se declínio desta. Já nos tratados com BZN, observou-se declínio da atividade após 4 dias de tratamento, como mostra a figura 11. Entretanto, ambos os tratamentos mantiveram a indução do CYP1A1 até 30 dias.

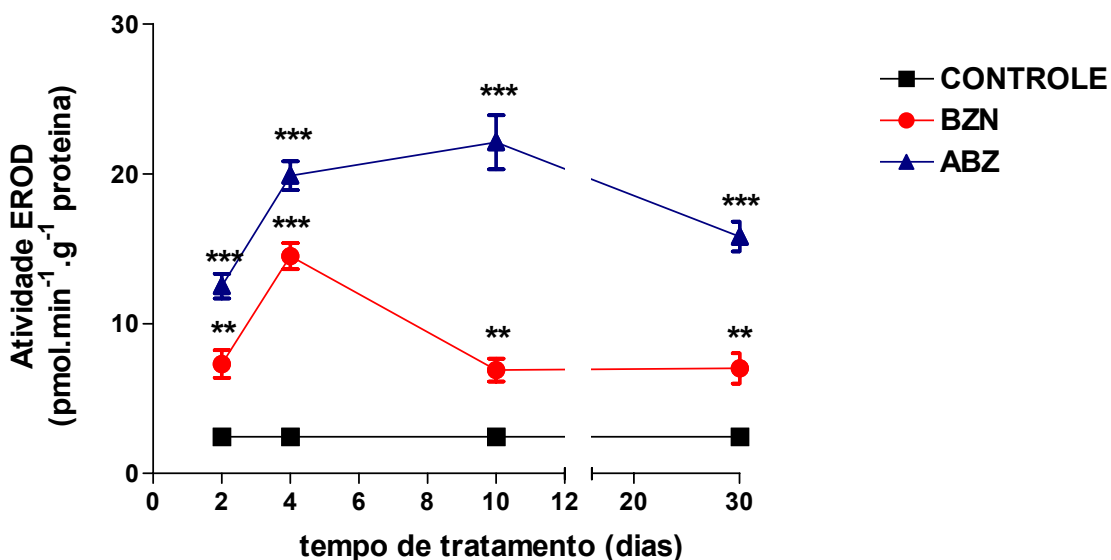


Figura 11: Atividade EROD ($\text{pmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) de microsomas de ratos tratados com 40mg/Kg de peso de BZN e ABZ e controles durante 2, 4, 10 e 30 dias de tratamento. (***) demonstra diferenças significativas ($p < 0,001$), (**) demonstra diferenças significativas ($p < 0,01$) e (*) demonstra diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$

5.2 Avaliação da indução da atividade da GST

5.2.1 Atividade GST dose dependente

A atividade da GST foi significativamente diminuída com o tratamento com o BZN, a partir da dose de 20 mg quando comparada ao controle (Figura 12). No tratamento com ABZ foi observado um crescente aumento da atividade da enzima com o aumento da dose.

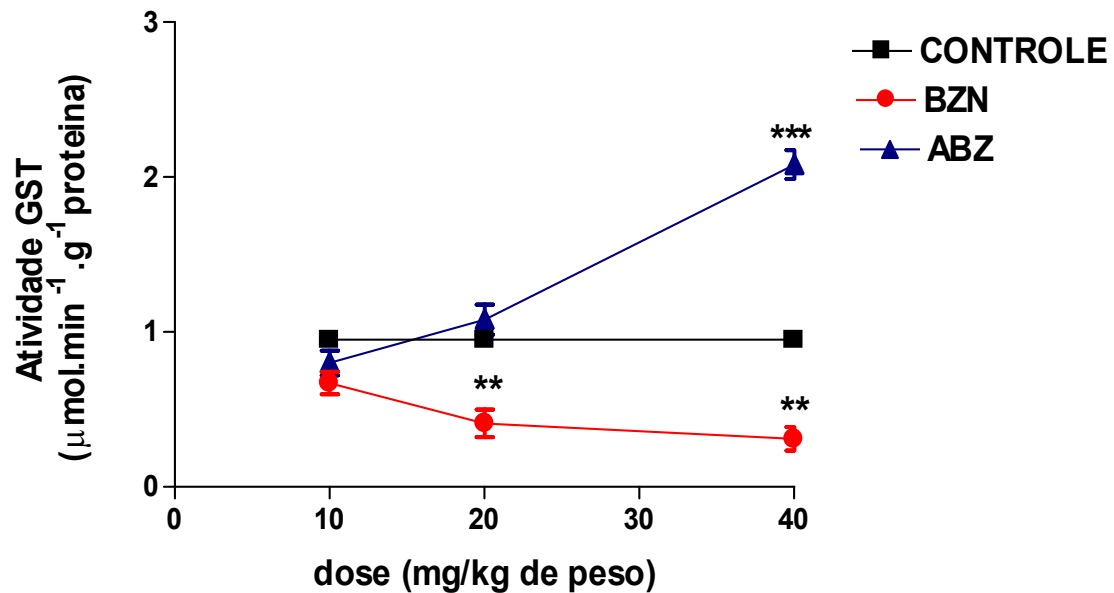


Figura 12: Atividade da glutatona S-transferase (GST; $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em fígado de ratos tratados com 10, 20 e 40 mg/Kg de peso durante 4 dias com BZN e ABZ. (**) demonstra diferenças significativas ($p < 0,01$) e (***) demonstra diferenças significativas ($p < 0,001$) em relação aos controles. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$.

5.2.2 Atividade GST tempo-dependente

A atividade da GST, enzima da fase II de biotransformação de fármacos, foi significativamente diminuída com o tratamento com BZN, principalmente nos 4 primeiros dias, quando comparados ao controle (Figura 13). O tratamento com ABZ mostrou um efeito oposto, apresentando crescente indução da atividade da enzima durante todo o período experimental, sendo significativo a partir do 10º dia (Figura 13).

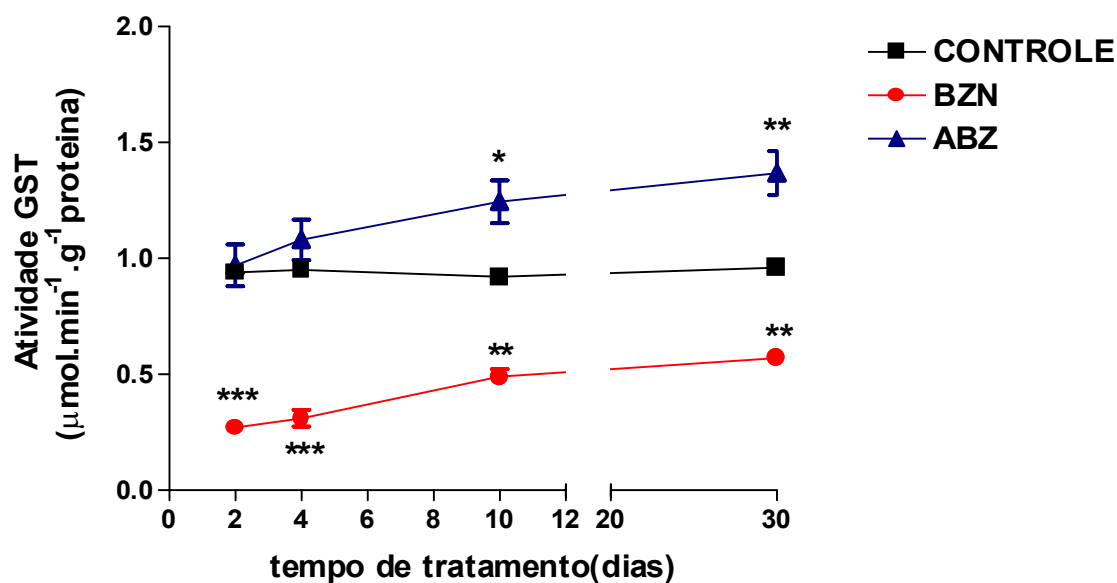


Figura 13: Atividade da glutatona S-transferase (GST; $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em fígado de ratos tratados com 40 mg/Kg de peso de BZN e ABZ em 2, 4, 10 e 30 dias de tratamento. (*) demonstra diferença significativa ($p < 0,05$), (**) demonstra diferenças significativas ($p < 0,01$) e (***) demonstra diferenças significativas ($p < 0,001$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$.

5.3 Avaliação da indução da atividade da UGT

5.3.1 Atividade UGT dose-dependente

A atividade da ácido glicurônico uridina difosfato transferase, outra enzima importante da fase II de biotransformação de fármacos, foi significativamente aumentada nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg de peso para o tratamento com ABZ, e 40 mg/kg de peso para o tratamento com BZN (figura 14).

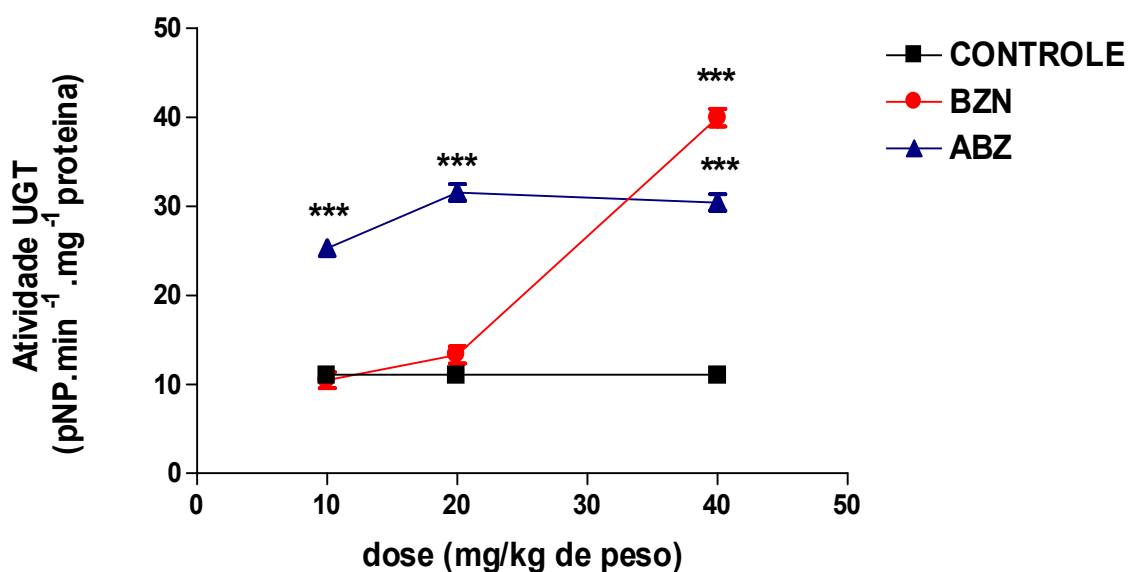


Figura 14: Atividade do ácido glicurônico uridina difosfato transferase (UGT) em microsomos de fígado ratos tratados com doses de 10, 20 e 40 mg/Kg de peso durante 4 dias com BZN e ABZ. (***) demonstram diferenças significativas ($p < 0,001$) em relação aos controles. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$.

5.3.2 Atividade UGT tempo-dependente

A atividade do ácido glicurônico uridina difosfato transferase, foi significativamente aumentada com o tempo de exposição aos fármacos (figura 15). Durante todo tratamento com o BZN, a atividade desta enzima permaneceu elevada em relação ao controle, porém, com o ABZ a atividade da enzima foi significativamente aumentada somente após 4 dias de tratamento, e se estabilizando após 10 dia.

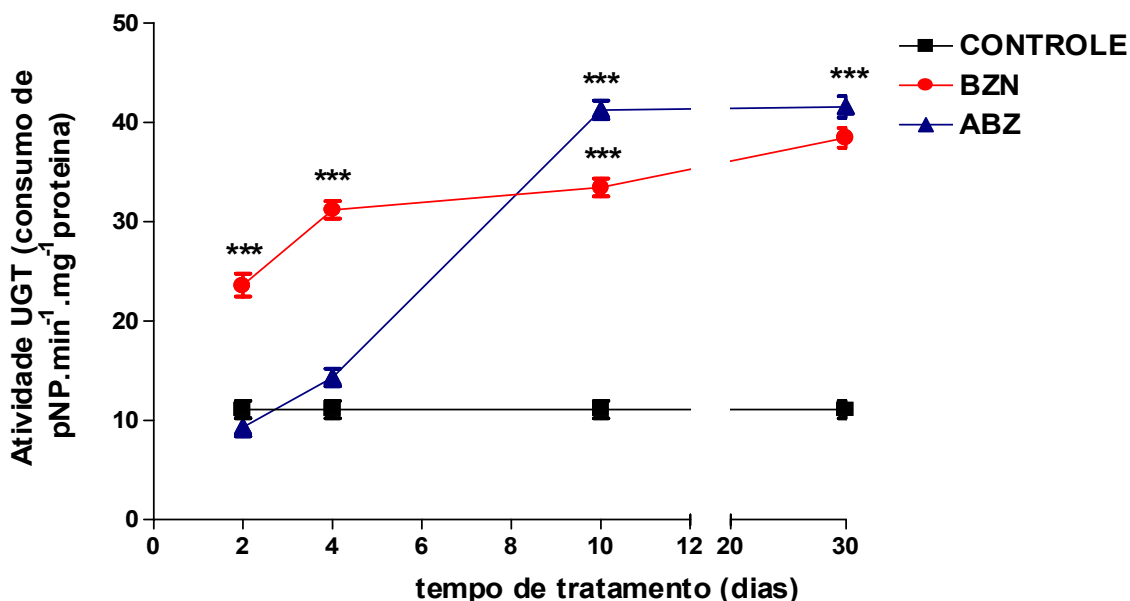


Figura 15: Atividade da ácido glicurônico uridina difosfato transferase (UGT) em microsomos de fígado ratos tratados com 40 mg/Kg de peso de BZN e ABZ por diferentes períodos de tempo. (***) demonstram diferenças significativas ($p < 0,001$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$.

PARTE II – ESTRESSE OXIDATIVO E INDUTORES/INIBIDORES DE CYP1A1

5.4 MEDIDAS DE CONCENTRAÇÃO DE TBARS

A determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenatos de fígado representa uma forma de medida indireta do processo de lipoperoxidação *in vivo*. Os valores de TBARS foram estatisticamente maiores em todos os tratamentos realizados quando comparados ao grupo controle (figura 16), sendo mais acentuado nos ratos tratados com BZN. Entretanto, esta lipoperoxidação foi quase completamente revertida pelo tratamento com a ANF para os níveis de controle.

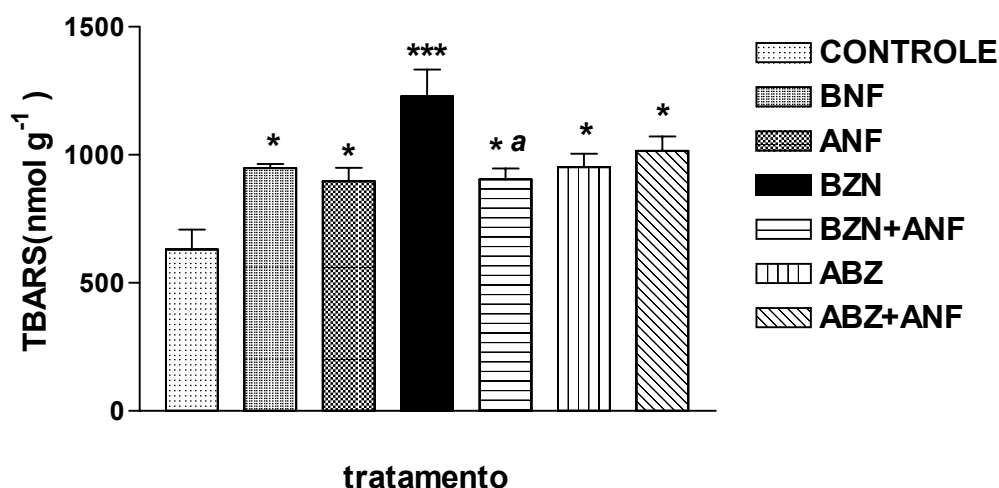


Figura 16: Concentração de TBARS (nmol g⁻¹) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p, 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o). (***) demonstra diferenças significativas ($p < 0,001$) e (*) demonstra diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle. (a) demonstra diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao tratamento com BZN. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, n = 6.

5.5 Antioxidantes Enzimáticos

5.5.1 Glutationa Redutase

A atividade da glutathione redutase foi significativamente reduzida em todos os tratamentos, com exceção ao tratamento com ABZ (Figura 19). Esta redução foi mais acentuada no tratamento com BZN, indicando que este fármaco possivelmente poderia ser um inibidor da enzima glutathione redutase.

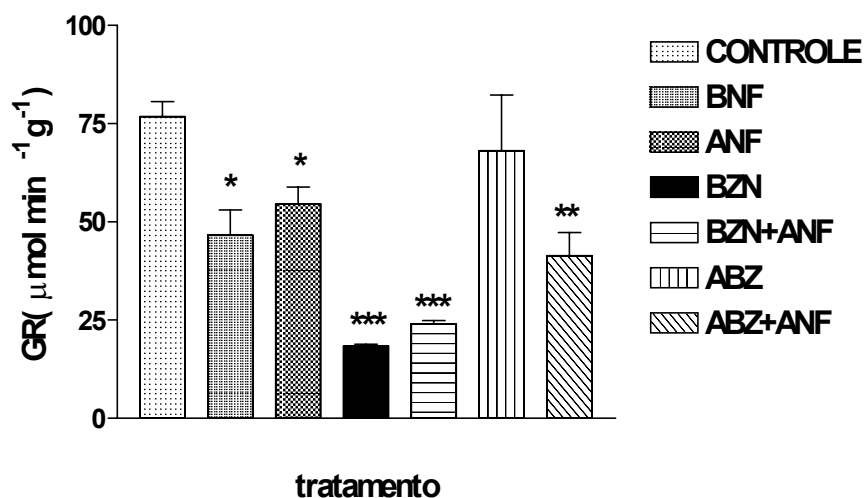


Figura 17: Atividade da glutathione redutase (GR; $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p, 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o). (*) demonstra diferença significativa ($p < 0,05$), (**) demonstram diferenças significativas ($p < 0,01$) e (***) demonstra diferenças significativas ($p < 0,001$) em relação aos controles. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, $n = 6$.

5.5.2 Glutathione Peroxidase

Houve uma elevação estatisticamente significativa na atividade da GPx mediante todos os tratamentos, com exceção daquele com BZN, quando comparados ao grupo controle (Figura 18). É interessante notar que a ANF foi capaz de diminuir a indução da atividade da GPx nos animais tratados com ABZ, mesmo que esta diferença não tenha sido significativa.

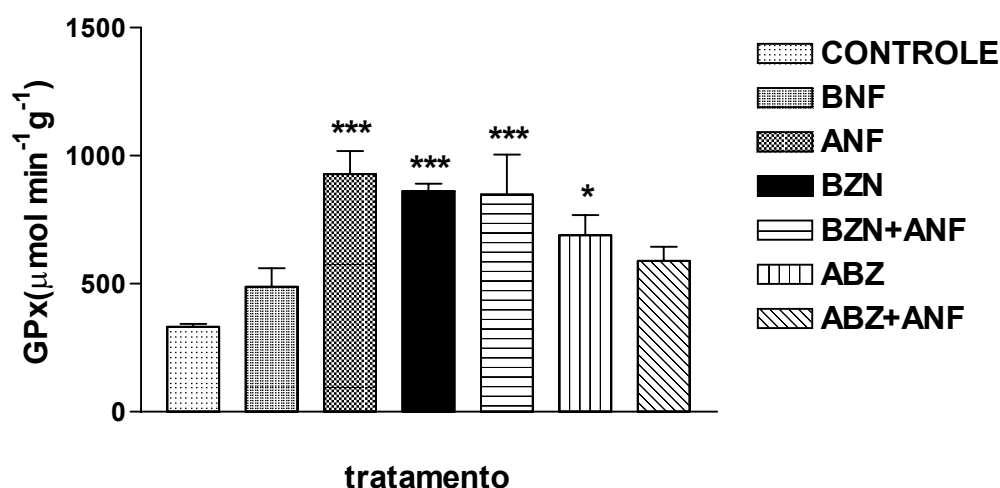


Figura 18: Atividade da glutathione peroxidase (GPx; $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p., 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o). (***) demonstra diferença significativa ($p < 0,001$), e (*) demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, $n = 6$.

5.5.3 Catalase

A atividade da CAT mostrou-se significativamente elevada nos tratamentos com BZN, BNF e ANF, quando comparados ao grupo controle (Figura 19). Curiosamente, os tratamentos com ABZ não causaram modificações na atividade desta enzima.

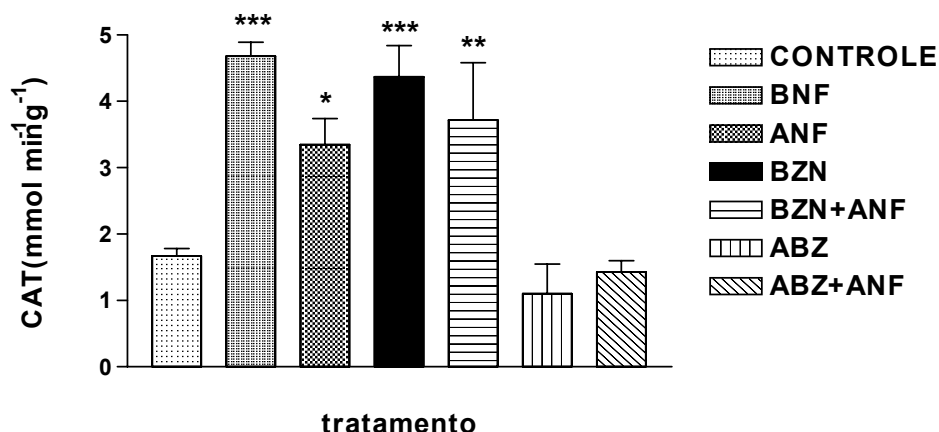


Figura 19: Atividade da catalase (CAT; mmol min⁻¹g⁻¹) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p, 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o) (***) demonstram diferenças significativas ($p < 0,001$), (**) demonstra diferença significativa ($p < 0,001$); e (*) demonstra diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, $n = 6$.

5.5.4 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH mostrou-se significativamente reduzida nos tratamentos relacionados ao BZN, ABZ e ANF quando comparados ao grupo controle (Figura 20). Somente o tratamento com BNF não causou inibição da atividade desta enzima.

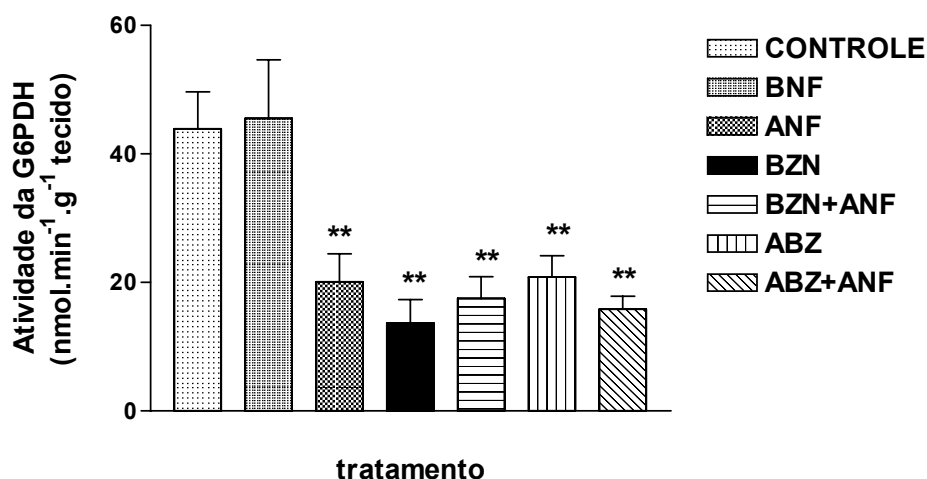


Figura 20: Atividade da glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH; mmol min⁻¹g⁻¹tecido) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p, 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o). (**) demonstra diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, n = 6.

5.6 Antioxidantes não enzimáticos

5.6.1 Glutationa Total; Glutationa reduzida e Glutationa Oxidada

Somente o tratamento com BNF foi capaz de elevar a concentração de GT (Figura 21), efeito este que não foi observado no tratamento simultâneo com ANF. Os níveis de GSSG também se mostraram elevados no tratamento com BNF (Figura 23) quando comparados aos animais controle. Entretanto, todos os tratamentos realizados elevaram significativamente os níveis de GSH (Figura 22) quando comparados ao grupo controle.

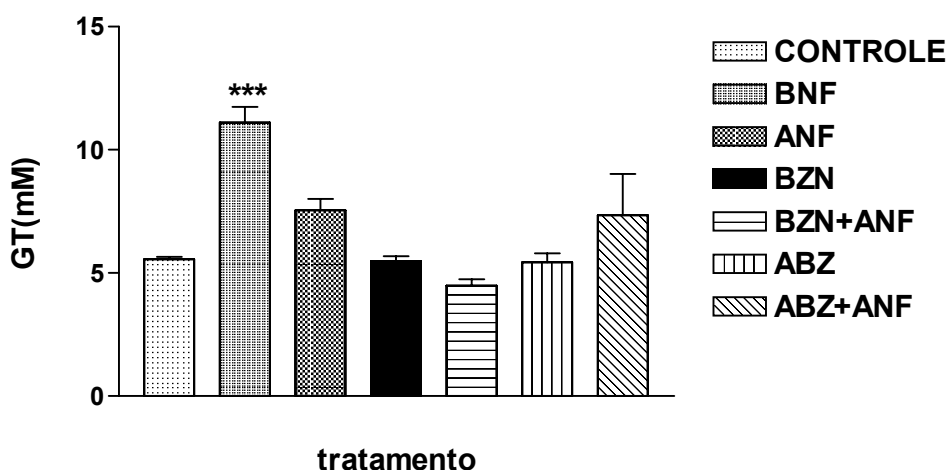


Figura 21: Níveis de glutathiona total (GT, mM) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o) (***)demonstra diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, $n = 6$.

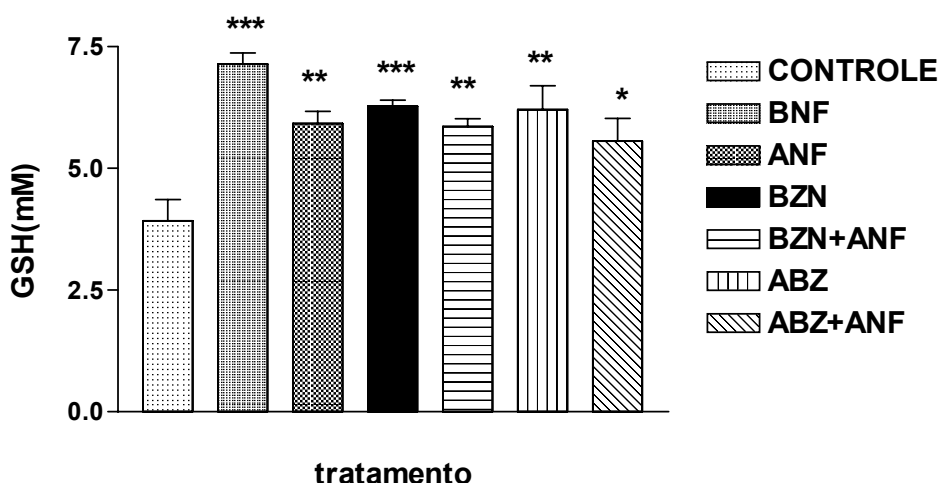


Figura 22: Níveis de glutathiona reduzida (GSH, mM) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p, 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o) (***) demonstram diferenças significativas ($p < 0,001$), (**) demonstram diferenças significativas ($p < 0,001$) e (*) demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos controles. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, $n = 6$.

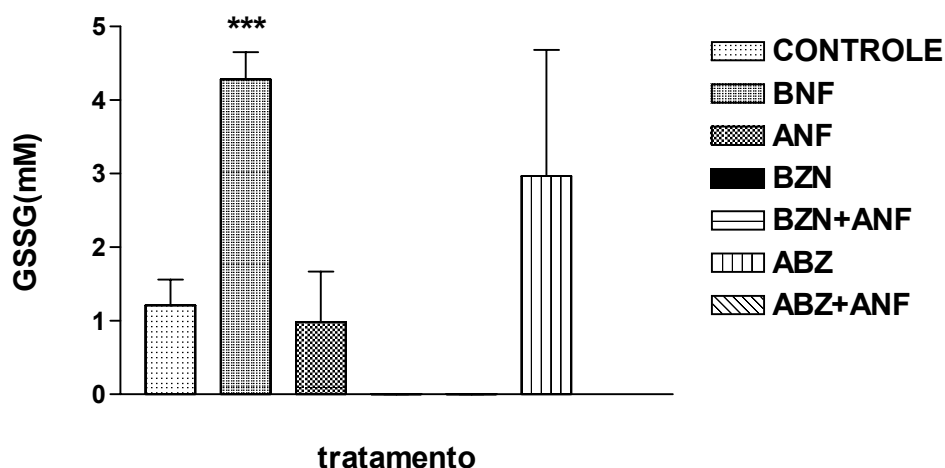


Figura 23: Níveis de glutathiona oxidada (GSSG, mM) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p, 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o). (***) demonstra diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, $n = 6$

5.7 Marcadores de função hepática

5.7.1 Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT)

A atividade da AST não demonstrou diferença significativa em relação ao controle em todos os tratamentos. Confirmando desta forma, a integridade hepática dos animais tratados (figura 24A). No entanto a atividade da ALT parece ter sido inibida em todos os tratamentos, principalmente nos tratamentos que envolvem os fármacos BZN e ABZ quando comparados com o controle (figura 24B).

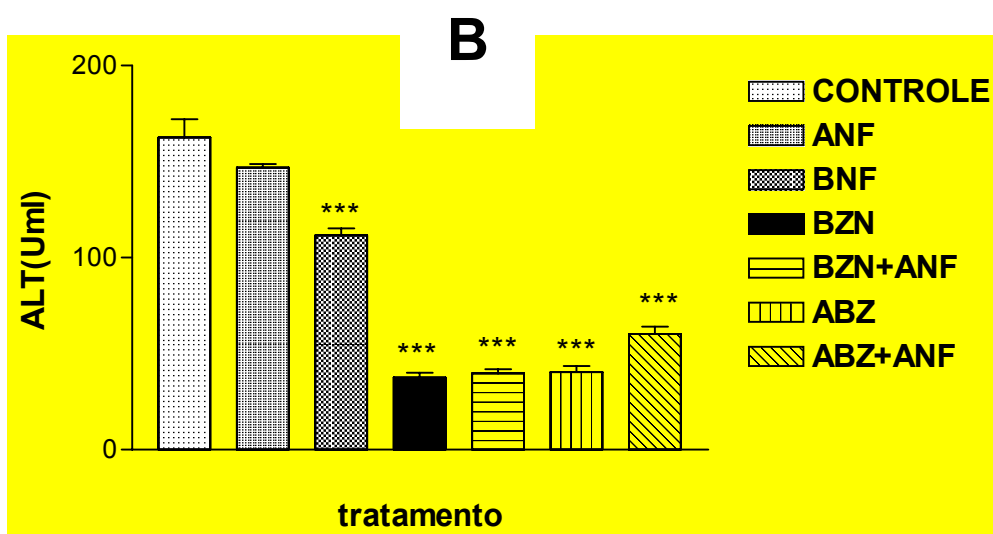
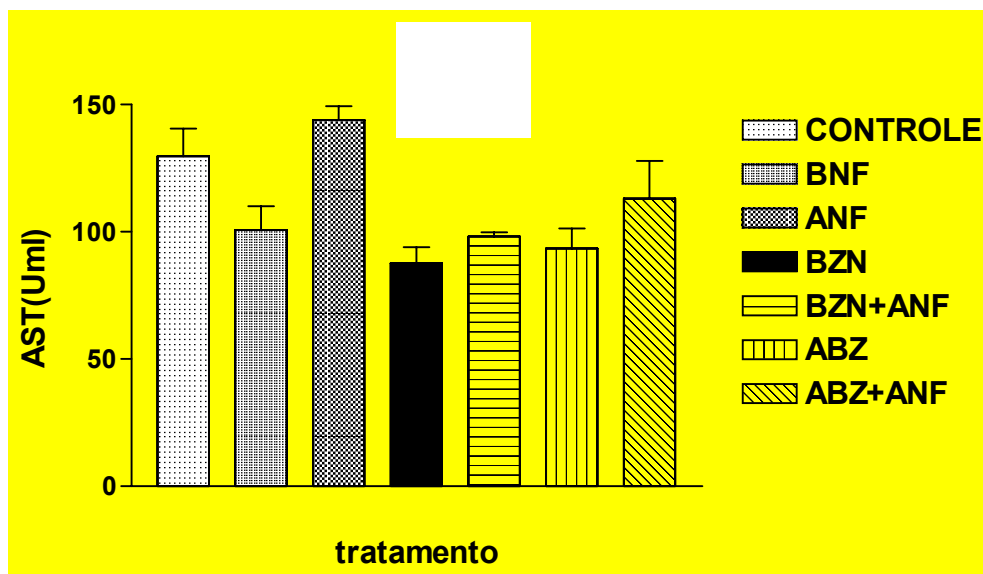


Figura 24: Atividade das enzimas AST e ALT (U/ml) em fígados de ratos controle e tratados com β -naftoflavona (BNF, 100mg/kg, i.p.), α -naftoflavona (ANF, 250 mg/kg, v.o), benzonidazol (BZN, 40mg/kg, i.p.), BZN+ANF (40mg/kg i.p, 250 mg/kg v.o), albendazol (ABZ, 40 mg/kg) e ABZ+ANF (40 mg/kg i.p., 250 mg/kg, v.o). (***) demonstra diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM, $n = 6$

6 DISCUSSÃO

6.1 ANTI-CHAGÁSICO (BZN)

A quimioterapia da doença de Chagas é realizada através da administração de dois fármacos, o nifurtimox e o BZN, sendo que o primeiro não vem sendo mais utilizado no Brasil devido à gravidade de seus efeitos tóxicos. A capacidade terapêutica destes fármacos não está muito clara e a sua utilização está associada à alta incidência de sérios efeitos colaterais (MORELLO, 1988). Pesquisas recentes demonstraram a alta incidência de neoplasias em pacientes transplantados que fizeram uso do BZN (BOCCHI, 1999), o que sugere a necessidade de um melhor entendimento da correlação risco/benefício deste fármaco.

Os dados obtidos no presente estudo mostraram claramente uma elevação da atividade EROD, medida indireta do CYP1A1, dose-dependente e sustentada durante 30 dias de tratamento. Estudos anteriores realizados em nossos laboratórios demonstraram também uma elevação da expressão desta isoforma a partir de 4 dias de exposição ao BZN (DE BEM, 2001). Desta forma, pode-se supor que a elevação da sua atividade específica efetivamente traduz uma elevação na concentração, e portanto, na expressão da isoforma CYP1A1. Em consequência, podemos considerar que o BZN seria um indutor do CYP1A1, e que este efeito indutivo seria tempo e dose-dependente.

É importante ressaltar que em todos os experimentos conduzidos com objetivo de avaliar o estresse oxidativo e indução de enzimas de biotransformação não ocorreu lesão celular pelos diferentes tratamentos. Isto pode ser demonstrado pela ausência de qualquer alteração significativa na atividade da transaminases (AST), enquanto a atividade da ALT aparentemente sofreu uma inibição pelo tratamento com BZN e ABZ.

As enzimas do CYP450 têm grande importância no metabolismo oxidativo de xenobióticos. A utilização do oxigênio molecular combinado com a oxidação do NADPH reflete o mecanismo pelo qual estes compostos são biotransformados, sendo as ERO um produto secundário deste processo enzimático (SEVANI et al., 1990). Considerando que a peroxidação lipídica elevou-se com o tratamento com BZN, da mesma forma que a indução do CYP1A1, poderia-se supor que os níveis de TBARS estariam refletindo a geração de ERO por este sistema de biotransformação. Este alto índice de oxidação lipídica indica que os animais estão participando de um processo oxidativo, e que a isoforma CYP1A1 deve ter um importante papel na toxicidade tecidual. Entretanto, estudos mais específicos são necessários para que se pudesse efetivamente comprovar a hipótese de elevação dos níveis de ERO via CYP1A1.

Neste sentido, foram realizados outros ensaios onde foi mantida a dose e o tempo de melhor indução do CYP1A1, ou seja 40 mg/kg de peso durante 4 dias, sendo administrada a ANF, um inibidor específico desta isoforma. Caso fosse correta a hipótese de que a indução CYP1A1 seria a fonte geradora de ERO, esperava-se suprimir a atividade EROD e, conseqüentemente, diminuir os níveis de lipoperoxidação, bem como atingir uma normalização das defesas antioxidantes.

Os resultados obtidos confirmaram parcialmente esta hipótese, uma vez que, efetivamente, houve uma diminuição dos níveis de TBARS nos animais tratados com BZN e ANF, sugerindo uma proteção contra a lipoperoxidação induzida por este último fármaco.

Por outro lado, as defesas antioxidantes apresentaram um comportamento surpreendente uma vez que nem as enzimas citoprotetoras nem o conteúdo de tióis de defesas antioxidantes apresentaram diferença significativa nas suas atividades e concentrações, quando comparados aos grupos de animais tratados com BZN e os tratados com BZN e ANF. Entretanto, ambos os grupos apresentaram estas defesas significativamente alteradas quando comparadas ao grupo controle não tratado. Além disto, seus perfis de indução de dano lipoperoxidativo e de defesa antioxidantes foram parcialmente semelhantes a aquele apresentado pelo BNF, indutor específico do CYP1A1.

É importante destacar que houve uma diferença significativa na resposta das enzimas citoprotetivas, GPx, GR e G6PDH frente ao tratamento com BZN e BNF. Além disso, o tratamento com ANF não alterou a resposta enzimática decorrente da exposição ao BZN. Particularmente consistiu o forte decréscimo na atividade da GP6DH, e a concomitante baixa da atividade da GR frente à exposição ao BZN, sugerindo desta forma, uma possível restrição do suprimento de NADPH devido à inibição da enzima geradora de potencial redox, com conseqüente repercussão sobre a GR, enzima responsável pela reciclagem da GSSG. Entretanto, se observarmos as concentrações de GSH, podemos notar que houve diferenças significativas com os diferentes tratamentos em relação ao grupo não tratado. Em conseqüência, seria possível, especular que provavelmente a *síntese de novo* da GSH foi acionada, no sentido de compensar a baixa capacidade de regeneração deste tiol pela GR, considerando a provável inibição da G6PDH. Para confirmar esta hipótese, seria necessário avaliar a atividade da δ -glutamil-sintetase, enzima responsável pela síntese da GSH.

O sistema de monooxigenases CYP450 consiste em uma grande família de enzimas responsáveis pela oxidação de xenobióticos. A subfamília CYP1A1 tem um importante papel na bioativação de um grande número de carcinógenos químicos e contaminantes ambientais. Fatores endógenos e exógenos como esteróides, fármacos e produtos químicos podem modular as enzimas do CYP450. Alterações no “pool” das enzimas do sistema P450 podem influenciar o processo de biotransformação de xenobióticos em animais (GUENGERICH, 1990). O uso de omeprazol, por exemplo, leva à indução do CYP1A1 em cultura primária de hepatócitos humanos (PEDROSA et al., 1994). Vários estudos que utilizam hepatócitos de coelho têm mostrado um aumento similar na expressão do CYP1A1, em resposta a derivados benzimidazólicos como lanzoprazol, tiabendazol e pantoprazol (PEDROSA et al., 1994; RICHARD et al., 1995; MASUBUCHI; OKASAKY, 1997), demonstrando a possibilidade de ocorrência dos efeitos tóxicos destas enzimas quando biotransformam fármacos e carcinógenos. Como a utilização de certos fármacos é indispensável, torna-se necessário conhecer melhor o processo de biotransformação e seus metabólitos ativos, para evidenciar eventuais correlações com o dano oxidativo e o potencial mutagênico e carcinogênico, bem como uma avaliação do risco/benefício envolvidos em sua utilização.

As UGTs compreendem uma grande família de enzimas capazes de neutralizar uma grande variedade de compostos metabólitos reativos catalisando a sua conjugação com a UDPGA (SAGARA et al., 1998; IYER; SINZ, 1999). Um aumento da atividade desta enzima da fase II de biotransformação pode tanto indicar uma possível neutralização dos efeitos das ERO como indicar uma situação de estresse oxidativo. Como esta enzima possui esta dupla função, os dados aqui obtidos sugerem que ela foi induzida pelo BZN, refletindo um aumento da capacidade antioxidante e de biotransformação, combinadas com a alta peroxidação lipídica nos hepatócitos expostos ao BZN. Além disso, esta indução foi dose e tempo-dependente e acompanhada de perto pela indução simultânea do CYP1A1. É interessante observar que a UGT, tanto quanto o CYP1A1, são enzimas de localização microsomal que são fortemente co-induzidas por indutores específicos desta isoforma do sistema P450, particularmente a BNF e o 3-metilcolantreno (EMBOLA et al., 2002; SAVENIJE-CHAPEL, BAST; NOORDHOEK, 1983)

Curiosamente a GST teve sua atividade reduzida pelo tratamento com o BZN da mesma forma que a GR, enzima responsável pela regeneração da glutatona. Desta forma, poderíamos supor que pode ter existido uma redução do suprimento do GSH celular, que poderia repercutir na atividade da GST que tem este tiol não proteico como substrato para reação de conjugação.

Relativamente às defesas antioxidantes, a CAT catalisa a decomposição do H_2O_2 para produzir água e oxigênio molecular, e, conseqüentemente, tem um importante papel na proteção das células contra o dano oxidativo. A elevada atividade da CAT frente ao tratamento com BNF e BZN sugere uma alta geração endógena de peróxido de hidrogênio, o que poderia determinar um aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio dentro da célula, elevando o risco de um estresse oxidativo e o início do processo de apoptose (BOVERIS; CADENAS, 1997; NEBERT et al., 2000).

A GPx possui uma função complementar à CAT, sendo, contudo, mais importante nas reações de detoxificação dos peróxidos orgânicos produzidos durante o estabelecimento do estresse oxidativo (FLOHÉ; GUNZLER, 1982; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). No presente estudo, o comportamento da GPx mostrou-se, em geral semelhante ao da CAT, sugerindo novamente que os indutores

de CYP1A1 analisados parecem gerar concentrações substanciais de peróxido de hidrogênio. Aparentemente este excesso de H_2O_2 não seria totalmente neutralizado levando, conseqüentemente, à lipoperoxidação elevada, o que foi efetivamente evidenciado.

A glutathione, um tripeptídeo que contém cisteína, tem um importante papel como primeira defesa celular contra o estresse oxidativo (MEISTER, 1983), também protegendo as células contra outros insultos tóxicos como metabólitos reativos e processos infecciosos. Como todas as células eucariontes contém altas concentrações de GSH (WILHELM FILHO et al., 2000), e a depleção deste peptídeo causa um imediato dano celular, a manutenção dos níveis adequados de GSH é indispensável para a sobrevivência e o desenvolvimento das funções normais das células (KOSOWER; KOSOWER, 1978). A elevação dos níveis de GSH observada com os diferentes tratamentos demonstra a capacidade da célula hepática em adaptar-se à presença destes fármacos. Entretanto, concentrações elevadas destes compostos poderiam gerar uma situação de estresse conforme demonstrou Moncada, (1989) obtendo, através de um ensaio *in vitro*, um decréscimo no conteúdo de GSH, onde foram utilizadas concentrações de BZN superiores às utilizadas neste ensaio. Por outro lado, a depleção de GSH isoladamente não deve ser um requerimento necessário para a estimulação do processo de peroxidação lipídica. De acordo com Dubin, Goyman e Stoppani (1984), a geração de ERO através do ciclo redox dos fármacos heterocíclicos, deve ser o fator determinante no processo peroxidativo e no seu aumento através da diminuição da capacidade antioxidante celular ou vice-versa.

O processo enzimático e não enzimático de detoxificação de ERO pela GSH produz glutathione oxidada (GSSG). Como pequenos aumentos das concentrações de GSSG após insulto tóxico e um estresse oxidativo, é muito deletério às células, a GSSG é transportada para o compartimento extracelular quando uma concentração crítica de GSSG é atingida no citoplasma, causando uma depleção no nível intracelular de glutathione (MEISTER, 1983). Níveis de GSSG acima de 1-2 % são tóxicos e considerados um índice de dano oxidativo em células de mamíferos (KOSOWER; KOSOWER, 1978; MEISTER, 1983). A glutathione redutase (GR) regenera GSH a partir de GSSG em presença de NADPH, e uma regeneração podem prevenir a perda celular de GSH. A inibição da atividade da GR observada

em com quase todos os tratamentos realizados, notadamente aqueles com BZN, provavelmente ocorreu no sentido de compensar a depleção de GSH, e pela impossibilidade de regeneração deste antioxidante pela depleção dos níveis de NADPH. A inibição parece constituir um fenômeno comum desta enzima frente a fármacos nitroheterocíclicos (DUBIN; GOYMAN; STOPPANI, 1984; PEDROSA et al., 2001). Uma diminuição da atividade da GR inviabilizaria a recuperação da GSH. Entretanto, os aumentos nas concentrações de GSH sugerem que ocorreu uma síntese *de novo* da glutathiona, provavelmente via δ -glutamil-sintetase. (DUBIN; GOYMAN; STOPPANI, 1984).

Além de apresentar uma eficácia relativa, o BZN apresenta sérios efeitos colaterais como neuro e dermatotoxicidade, as quais ocorrem em cerca de 30% dos pacientes que recebem o tratamento, mas, em geral, estas manifestações não justificam a sua interrupção (GONTIJO; GALVÃO, 1999). Testes de mutagenicidade têm mostrado o potencial genotóxico deste derivado imidazólico (FERREIRA; SCHWARZ; FERREIRA, 1988). Consistente com estas observações, Teixeira e colaboradores (1990) relataram o desenvolvimento de linfomas em coelhos tratados com BZN, enquanto BOCCHI et al. (1994, 1994) encontraram uma alta incidência de neoplasia maligna após transplantes cardíacos em pacientes que tiveram tratamento crônico com BZN. Todavia, resultados contraditórios foram demonstrados por Souza, Catarina e Silva (1991), que não observaram aumento na frequência de aberrações cromossômicas ou na frequência de micronúcleos em medula de roedores submetidos a tratamentos crônico e agudo com BZN, contrariando os resultados positivos na frequência de aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleos em cultura de linfócitos do sangue periférico de crianças tratadas com doses terapêuticas de BZN por 30 dias (GORLA et al., 1988).

O fato de que o efeito de fármacos nitroheterocíclicos como o BZN e o nifurtimox, e de outros agentes tripanocídicos, poderem ser antagonizados por varredores ("scavengers") de ERO (DUBIN; GOYMAN; STOPPANI, 1984), reforça o argumento de que ambos nitroimidazólicos também agem através da geração de ERO. Ambos fármacos provocam um efeito similar em várias cepas de *T. cruzi*, causando depleção do conteúdo de glutathiona total em aproximadamente 5 vezes (MORELLO, 1988; DUBIN; GOYMAN; STOPPANI, 1984). A dosagem preconizada

na terapia da doença de Chagas situa-se entre 5 e 10 mg/Kg de peso corporal, durante 30 a 60 dias, dependendo da gravidade do caso e do índice de parasitemia. Em procedimentos pré-operatórios para transplantes cardíacos, a dose de BZN utilizada é 4 a 5 vezes mais alta (KOROLKOVAS, 1999; BOCCHI et al., 1994; 1999). No presente estudo, os efeitos adversos causados pelas ERO estiveram refletidos no insulto oxidativo originado pelo uso de doses terapêuticas, provavelmente pela indução do sistema CYP1A1.

Nossos resultados demonstraram claramente que os animais que receberam o tratamento com BZN apresentavam uma condição de estresse oxidativo. Ocorreu uma evidente indução das atividades da CAT e da GPx, e também uma inibição das enzimas GR e G6PDH, sem contudo provocar uma depleção importante da GSH. Paralelamente houve um aumento nos níveis de TBARS, sugerindo que os animais aparentemente foram incapazes de manifestar uma resposta compensatória mais prolongada, face aos contínuos danos provocados pelas ERO decorrente da exposição aos derivados imidazólicos. Simultaneamente, houve uma indução progressiva da isoforma CYP1A1, a qual está diretamente associada à ativação de compostos pró-carcinogênicos, geração de intermediários altamente reativos e ERO. Também ocorreu uma elevação na atividade da enzima UGT, e redução da GST, ambas enzimas claramente associadas com a neutralização de ERO bem como com a excreção de xenobióticos. Estes resultados enfatizam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a toxicidade e papel das ERO nas defesas antioxidantes geradas pelo BZN, tanto no parasita quanto no próprio hospedeiro.

6.2 ANTIHELMÍNTICO (ABZ)

As infecções causadas por helmintos em humanos podem ser tratadas basicamente com um destes cinco antihelmínticos: albendazol, mebendazol, dietilcarbamazina, ivermectina ou praziquantel. Estes fármacos são vitais, não somente para o tratamento dos indivíduos infectados, mas também no controle dessas infecções (SILVA; GUYATT; BUNDY, 1997). O primeiro fármaco derivado

benzimidazol introduzido no tratamento das helmintíases humana, foi o tiabendazol em 1964. Apesar de serem utilizados já há muitos anos, ainda não se sabe ao certo o mecanismo de ação destes fármacos, mas existem evidências de que os mesmos estejam associados à geração de ERO (LOCATELLI, 2001).

A ação pró-oxidante induzida pelos fármacos anti-helmínticos ainda não foi estudada em hospedeiros como rato e homem, sendo somente avaliado seu aspecto oxidativo nos helmintos parasitas. Entretanto, estima-se que estes fármacos, quando absorvidos, possam exercer sua toxicidade através da geração das ERO, podendo inclusive apresentar hepatotoxicidade (SANCHEZ-MORENO et al., 1996).

O aumento na lipoperoxidação tecidual verificado nos animais tratados com ABZ foi relativamente menor que aquela causada pelo BZN. Esta diferença pode estar associada ao fato do tratamento com ABZ causar uma menor diminuição da atividade da GR que o BZN apesar de ambos causarem igual inibição da G6PDH.

No presente estudo, o ABZ mostrou-se um potente indutor do CYP1A1. Esta indução parece ser dose e tempo-dependente, sendo aparentemente superior àquela causada pelo BZN a partir de 4 dias. Estes resultados assemelham-se àqueles aos resultados obtidos por Souhaili-El Amri et al. (1988), e Asteinza et al. (2000), quando demonstraram que a atividade da 7-etoxyresorufina O-deetilase aumentou até 30 vezes em relação aos animais controles, após tratamento com ABZ 10 e 50mg/Kg, por 4 e 10 dias.

Muitos fármacos benzimidazóis que contém enxofre parecem apresentar uma indução do sistema CYP450 hepático. Alguns deles com atividade antihelmíntica, como tiabendazol, fenbendazol e o sulfóxido de oxfendazol, induzem a sub-família P4501A em microsomas de coelhos. Em ratos, o ABZ e um agente antiúlcera, o omeprazol, induzem tanto a família P4501A como a 3A6 e 3A4. Estes compostos benzimidazóis geralmente apresentam uma ação de ativadores da transcrição destes genes (REY-GROBELLET et al., 1996).

Classicamente, em vertebrados ou invertebrados, a biotransformação de xenobióticos inclui duas fases. A primeira fase pode ser de oxidação, o que eventualmente pode levar à geração de metabólitos intermediários altamente reativos e, particularmente, nucleofílicos. Em uma fase subsequente, estes

metabólitos se complexam ou se conjugam com moléculas de baixo peso molecular ou de elevada polaridade, principalmente a GSH e UDPGA (KERBOEUF et al., 1995). Desta forma, a indução destas enzimas de fase II indicaria a necessidade de neutralização de ERO gerados na fase I de biotransformação. As reações da chamada segunda fase (Fase II) utilizam várias enzimas similares para catalisar as reações de conjugação, entre elas as da conjugação da glutathione e UDPGA (KERBOUF et al., 1999). GSTs foram encontradas em todas as espécies de helmintos, sendo estudadas principalmente em cestodas (BARRET, 1997). Um aumento da atividade da GST e UGT poderia neutralizar os efeitos das ERO produzidas em processos de metabólitos endógenos ou de fontes exógenas. Os dados aqui obtidos sugerem que estas duas enzimas da fase II de biotransformação foram induzidas pelo ABZ ao mesmo tempo em que ocorreu uma elevação da lipoperoxidação dos hepatócitos refletindo uma diminuição da capacidade antioxidante combinada com a alta peroxidação lipídica nos hepatócitos expostos acentuando o estresse oxidativo.

7 CONCLUSÕES

- Tanto o BZN como o ABZ provocaram uma elevação dos níveis de TBARS nos hepatócitos dos ratos tratados com estes derivados imidazólicos, durante praticamente todo o período experimental, sendo que esta elevação foi mais acentuada no tratamento com o BZN. O tratamento com o ANF, inibidor do CYP1A1, concomitante ao tratamento com o BZN, reverteu os níveis de lipoperoxidação.
- Ambos fármacos induziram o sistema de fase I (CYP1A1), de forma tempo e dose dependente. O ABZ promoveu indução mais acentuada que o BZN.
- De forma distinta o ABZ induziu o sistema de fase II, refletido pelos aumentos das atividades das enzimas GST e UGT, igualmente de modo tempo e dose-dependente o BZN provocou inibição, da GST em dose mais elevadas e ao longo do período experimental, enquanto que a UGT somente foi induzida em doses elevadas e maior tempo de exposição.
- O ANF, um inibidor do CYP1A1, diminuiu os níveis de TBARS relativamente ao tratamento com o BZN, mas não teve o mesmo efeito após o tratamento com o ABZ.
- Relativamente às enzimas antioxidantes, após o tratamento com ambos os fármacos, observou-se varias alterações nestes parâmetros: a GR foi inibida essencialmente face a todos os tratamentos, e o ANF mostrou uma forte tendência em reverter a indução causada pelo ABZ.
- De modo contrário à GR, a enzima GPx mostrou aumentos na sua atividade mediante quase todos os tratamentos, e novamente o tratamento com ANF produziu uma tendência de diminuição, apesar de não ser significativa.

- De forma semelhante, ocorreu uma forte indução da CAT, tanto pelo BNF e ANF, como pelo tratamento com o BZN, sugerindo uma elevação dos níveis endógenos de H_2O_2 , enquanto que o ABZ não promoveu alterações significativas.
- Somente o tratamento com o BNF promoveu elevação nos níveis da GT, enquanto os demais tratamentos não provocaram alterações neste antioxidante.
- Por outro lado, todos os tratamentos promoveram a elevação das concentrações da GSH, apesar da inibição generalizada da GR, sugerindo uma síntese *de novo* no fígado dos animais tratados.
- Somente o tratamento com o BNF promoveu elevação significativa dos conteúdos de GSSG, indicando um elevado estresse oxidativo decorrente deste tratamento.
- Resumidamente tanto o BZN como o ABZ promoveram uma condição de estresse oxidativo no fígado de ratos.
- Aparentemente, o estresse oxidativo decorrente do tratamento com o BZN foi revertido pelo inibidor do CYP1A1, o ANF, sugerindo que este fármaco pode gerar ERO associada ao processo de biotransformação da fase I.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol.** v. 105, p. 121-126, 1984.

AMSTAD, D.; CERUTTI, P. Geneticmodulations of the cellular antioxidant defense capacity. **Env. Health Persp.** v. 88, p. 77-82, 1990.

ASTEINZA, J., et al. Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. **Enviromental Toxicology and Pharmacology.** v. 9, p. 31-37, 2000.

BACHMANN, K., et al. In vivo evidence that Theophylline is metabolized principally by CYP1A in rats. **Pharmacology.** v. 47, p. 1-7, 1993.

BARRET, J. Helmint detoxification mechanisms. **J. Helminthol.** v. 71, p. 85-89, 1997.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** v. 61, p. 882-890, 1963.

BIDLACK, W. R.; BROWN, R. C.; MOHAN, C. Nutritional parameters that alter hepatic drug metabolism, conjugation, and toxicity. **Federation Proceedings.** v. 45, p. 142-148, 1986.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Meth. Enzymol.** v. 61, p. 882-890, 1963.

BOCCHI, E. A., et al. Higher incidence of malignant neoplasma after heart transplantation for treatment of Chaga's heart disease. **Eur. Heart. J.** v. 15, p. 179, 1994.

BOCCHI, E. A., et al. Higher incidence of malignant neoplasms after transplatation for treatment of chronic Chagas' heart disease. **J. Heart & Lung Transplatation.** v. 17, p. 399-405, 1999.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L. W. **Superoxide Dismutase.** CRC, Boca Raton. v. 2, p. 159-68, 1982.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function.** Marcel Decker: New York, v. 105, p 1-25, 1997.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Meth. Enzymol.** v. 113, p. 484-490, 1985.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Cellular sources and steady-state levels of reative oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function.** New York: Marcel Dekker. v. 105, p. 1-25, 1997.

CHANCE, E.; SIENS, H.; BOVERIS, A. Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** v. 59, p. 527-602, 1979.

CHANG, T. K. H.; GONZALEZ, F. J.; WAXMAN, D. J. Evaluation of Triacetyloleandomycin, α -Naphtoflavone and Diethyldithiocarbamate as selective

chemical probes for inhibition of human cytochrome P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 311, n. 2, p. 437-442, 1994.

CRISTOFOL, C., et al. Transplacental transport of netobimin metabolites in ewe. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.** v. 20, p.167-171, 1995.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Towards Prolongation of the Healthy Life Span**. v. 854, p. 435-43, 1998.

DANELISEN, I., et al. Maintenance of Myocardial Levels of Vitamin A in Heart Failure due to Adriamycin. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v.34, p. 789-795, 2002.

DE BEM, A. F. **Avaliação da expressão do citocromo P4501A1 hepático e das defesas antioxidantes em ratos tratados com Benznidazol**. 2001. 66 f.. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DE GROOT, H.; ANUNDI, I.; SIES, H. CYTOCHROME p450 AND LIPID PEROXIDATION. In: RUCKPAUL, K.; REIN, H., (eds). **Membrane Organization and Phospholipid Interacion of Cytochrome P-450**. Akademie Verlag, Berlin. p. 184-205, 1991

DENISON, M. S.; WHITLOCK, J. P. Jr. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 18175-78, 1995.

DI GIULIO, R. T., et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 8, p. 1103-1123, 1989.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas in: CINERMAN, B.; CINERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Ed Atheneu, p. 81-110, 1999.

DOCAMPO, R. Sensitivity of Parasites to Free Radical damage by Antiparasitic Drugs. **Chem. Biol. Interactions**. The rockerfeller university, New York, 1989.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free-radical intermediates in the antiparasitic action of frugs and phagocytic cells. **Free Radicals in biology**. Academic press, New York, 1984.

DUBIN, M.; GOIJMAN. S. G.; STOPPANI, A. O. M. Effect of nitroheterocyclic drugs on lipid peroxidation and glutathione content in rat liver extracts. **Biochem. Pharmacol.** v. 33, p. 3419-23, 1984.

EMBOLA C.W., et al. Induction of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UDP-GT1) gene complex by green tea in male F344 rats, **Food and Chemicha Toxicology**, v. 40, p. 841-844, 2002.

FERREIRA, R. C. C.; SCHWARZ, U.; FERREIRA, L. C. S. Activation of anti-*trypanosima cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microssomal enzymes. **Mutation Res.** v. 38, p. 577-83, 1988.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.** v. 105, p. 114-121, 1984.

FRIDOVICH, I. Hypoxia and oxygen toxicity In: FANH, S. et al., (ed), **Advances in Neurology**. New York: Raven. p. 225-26, 1979.

GILLES, M. H. In: COOK, G. C. **Manson's Tropical Diseases**. Twentieth edition, Saunders, 1996

GLOCK, G.; McLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rate liver. **Biochemistry**. v. 55, p. 400-07, 1953.

GOIJMAN, S. G.; FRASCH, A. C. C.; STOPPANI, A. O. M. Damage of *Typanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. **Biochem. Pharmacol.** v. 34, p. 1457-461, 1985.

GONTIJO, E. D.; GALVÃO, L. M. C.; ELOI-SANTOS, S. Chagas Disease: Criteria of cure and prognosis. **Men. Inst. Oswald Cruz**, vol. 94 (suppl. 1), p. 357-62, 1999.

GOODMAN, A. G.; LIMBIRD L. E. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Rio de Janeiro: Internacional Edition, 1996. 1009 p.

GORLA, N. B., et. al. Assessment cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. **Mutation Res.** v. 206, p. 217-20, 1988.

GRANCHAROV, K., et al. Natural and synthetic inhibitors of UDP - glucuronosyltransferase. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 89, p. 171-186, 2001.

GRINBLAT, L.; SREIDER, C. M.; STOPPANI, A. O. M. Superoxide anion proction by lipoamine dehydrogenase redox-cycling: effectof enzyme modifiers. **Biochem Int.** v. 25, p. 97-153, 1990.

GUEDES, P. M. M., et al. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. **Acta Tropica**. v. 84, p. 9-17, 2002.

GUENGERICH, P. F. Cytochrome P450: advances and prospects. **The FASEB Journal**. v. 6, p. 667-668, 1992.

GUENGERICH, P. F. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** v. 25, p. 97-153, 1990 .

GWADS, W.; HOSTEZ, J. **Parasitic Disease**. 3 ed. Springer-Verlag, 1995.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (y)-sensitiv transcription factors. **Cellular Signalling**. v. 14, p. 879-97, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, H. Biochemical mechanisms accouting for the toxic action of oxygen on living organisms. The key role superoxide dismutase. **Cell Biol. Int. Rep.** v. 2, p. 113-28, 1978.

HAUGAARD, N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. **Physiol. R.** v. 48, p. 311-73, 1968.

HOGDSON, E.; LEVI, P. E. Metabolism of toxicants. **Indroductio to Biochemical Toxicology**. 2 ed. Norwalk: Appleton & Lange. 1994.

IYER K. R.; SINZ M. W. Characterization of phase I and phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations, *Chemico-Biological Interactions*, p. 118:151-169, 1999.

Jl, L. L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 25, p. 225-231, 1993.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JACOB, W. B. Mechanism for the several activities from glutathione S-transferase. **Biol. Chem.** v. 251, p. 6183-188, 1974.

KELLING, P. L.; SMITH, L. L. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. **Biochem. Pharmacol.** v. 31, p. 3243-49, 1982.

KERBOUEUF, D., et al. In vivo metabolism of aminopyrine by the larvae of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. **Parasitol. Res.** v. 81, p. 302-04, 1995.

KERBOUEUF, D., et al. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. **Parasitol. Res.** v. 85, p. 713-18, 1999.

KITZMAN, D.; CHENG, K. J.; FLECKENSTEIN, L. HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v.30, p. 801-13, 2002.

KOIVUSAARI, U. Thermal acclimatization of Hepatic Polysubstrate Monooxygenase and UDP-Glucuronosyltransferase of Mature Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). **The journal of Experimental Zoology.** v. 227, p. 35-42, 1983.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ed. 1999/2000, 1999.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 475 p.

KOSOWER, N. S.; KOSOWER E. M. The glutathione status of cells. **Int. Ver. Cytol.** v. 54, p. 109-60, 1978.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radic. Biol. Med.** v. 7, p. 617-635, 1989.

LACEY, E. Mode of action of benzimidazole. **Parasitol. Today.** v. 6, p. 112-115, 1990.

LAVRIJSEN, K., et al., Induction potential of antifungals containing na imidazole or triazole moiety. Miconazole and ketoconazole, but not itraconazole, are able to induce hepatic drug metabolizing enzymes of male rat at high doses. **Biochem. Farmacol.** v. 35, p. 1867-78, 1986.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 2^o edition. New York: Worth Publishers, p. 436-437, 1993.

LEWIS, D. F. V. **Ccytochomes P450: Structure, Function and mechanism**. London: Taylor & Francis, 1996.

LIMA, M. H.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Parte B, v. 120, p. 437–448, 1998.

LOCATELLI, C. **Avaliação da expressão do citocromo P4501A1 hepático e das defesas antioxidantes em ratos tratados com albendazol e mebendazol**. 2001.

63 f.. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LOWRY, O. H., et al. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-75, 1951.

MASUBUCHI, N.; OKASAKI, O. Na evaluation of the CYP1A induction potencial of pantoprazole in primary rat hepatocytes: a comparasion with other proton pump inhibitors. **Chem. Biol. Interct.** v. 107, p. 63-74, 1997.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: na enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MEECH, R.; MACKENZIE, P. I. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.** v. 24, p. 907-915, 1997.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science.** v. 220, p. 445-47, 1983.

MIRANDA, C. L.; HENDERSON, M. C.; BUHLER, D. R. Evaluation of chemicals as inhibitors of trout cytochrome P450s. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.148, p. 237-244, 1998.

MONCADA, C., et al. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. **Comp. Biochem. Thysiol.** v. 94c, p. 87-91, 1988

MORELLO, A. The Biochemistry of the mode of action of drugs and the toxication mechanism in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 90c, p. 1-12, 1988.

MURRAY, R. K., et al. **Harper's biochemistry**. 25^o edition. EUA: LANGE medical book. p. 219-229, 2000.

NAGEL, R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. **Mulat res.** v.191, p. 17-20, 1987.

NERBERT, D. W.; GONZALES, F. J. P450 genes: structure, evolution, and regulation. **Ann. Ver. Biochem.** v. 56, p. 945-1043, 1987.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1984.

NIESINK, R. J. M.; VRIES, J.; HOLLINGER, M. A. **Toxicology: Principles and applications**. Boca Ration: CRC Press. p. 17-91, 1996.

OLIVEIRA, S. F., et al. Sera from chronic patients with complex cardiac arrhythmias depress eletrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. **Circulation**. v. 96, p. 2031-2037, 1997.

PEDROSA, R. C., et al. Omeprazole and lanzoprazole are mixed induces of CYP1A and CYP3A in human hepatocytes in primary culture. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 269, p. 384-92, 1994.

PEDROSA, R. C., et al. Resposta proliferativa das células T contra a cruzipaina na cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. De Médicos Trop.** v. 29 (4), p. 331-39, 1996.

PEDROSA, R. C., et al. Efeito do Albendazol na expressão do citocromo P450 1A1 e na geração de radicais livres. **Anal do VII Encontro Catarinense de Farmacêuticos Bioquímicos e v Congresso de Farmacêuticos e Bioquímicos.** Florianópolis, 1998.

PEDROSA, R. C., et al. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Report.** v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PROUGH, R. A.; BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Direct fluorimetric methods for measuring mixed function oxidase activity. **Meth. Enzymol.** v. 52, p. 373-77, 1978.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annu Ver. Physiol.** v.48, p. 657-67, 1986.

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. Free radicals. **A functional Approach IRL Press.** Oxford, p. 1., 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RASSI, J. A.; NETO, M. J. A. Cardiopatia Chagásica Crônica. **Rev. Soc. Cardiol. do Estado de São Paulo.** v. 10, n. 4, p. vi-xxxii, 2000.

REED, D. J. Regulation of reductive processes by glutathione. **Biochem. Pharmacol.** v. 35, p. 7-13, 1986.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. **Am J. Clin. Path.** v. 58, 1957. 65 p.

RICHARD, L., et al. Oxidative metabolism of lansoprazole by human liver cytochromes P450. **Molecular Pharmacol.** v. 47, p. 410-18, 1995.

SAGARA, Y., et al. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** v. 24, p. 1375-89, 1998.

SANCHEZ-MORENO, M., et al. Inhibition of superoxide dismutase from *Ascaris sunn* by Benzimidazoles and synthesized pyrimidine and glycine derivatives. **Pharmacol.** v. 52, p.61-68, 1996

SANDERINK, G. J., et al. Involvement of human CYP1A isoenzymes in the metabolism and drug interactions of Riluzole *in vitro*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 1997. v. 282, n. 3, p. 1465-1472.

SAVENI-CHAPEL, E. M.; BAST, A.; NOORDHOEK, J. Interaction of uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA) with cytochrome P450. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 35, p. 522-23, 1982.

SCHENKMAN, J. B.; CINTI, D.L. Preparation of microsome with calcium. **Methods Enzymol.** v. 52, p. 83-88, 1978.

SEVANIAN, A., et al. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cythochrome P450. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 8, p. 145-52, 1990.

SHIBA, D.; SHIMAMOTO, N. Attenuation of endogenous oxidative stress-induced cell eath by cytochrome P450 inhibitors in primary cultures of rat hepatocytes. **Free Radical Biology & Medicine.** v.27, p. 1019-26, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** v. 215, p. 213-219, 1993.

SIGNORINI, R.; SIGNORINI, R. Atividade física e radicais livres. In: GOHAYEB, N.; BARROS, T. (ed). **O Exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos gerais e preventivos.** São Paulo: Atheneu, 1995.

SILVA, N.; GUYATT, H.; BUNDY, D. Anthelmintics. A Comparative Review of their Clinical Pharmacology. **Drugs.** v. 53, n. 5, p. 769-88, 1997.

SOUHAILI-EL AMRI, H., et al. Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 92, p. 141-49, 1988

SOUZA, C. S., CATARINA, S. T., SILVA, J. S. Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. **Mutation Res.**, v. 259, p. 139-46, 1991.

SREIDER, C. M.; GRINBLAT, L.; STOPPANI, A. O. M. Catalysis of nitrofuram redox-cycling and superoxid anion production by heart lipoamide dehydrogenase. **Biochem. Pharmacol.** v. 40, p. 1849-57, 1990.

STOCKER, R.; MCDONAGH, A. F.; GLAZER, A. N.; AMES, B. N. Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. **Meth. Enzymol.** v. 186, p. 301-09, 1990.

STOKOL, T., et al. Development of bone marrow toxicosis after albendazole administration in a dog and cat. **JAVMA.** v. 210, n. 12, p. 1753-56, 1997.

STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. **Medicina.** v.59, p. 147-65, 1999.

TEIXEIRA, A. R. L., et al., Chaga's disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 43, p. 146-58, 1990 a.

TEIXEIRA, A. R. L., et al., Malignant non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi* infected rabbits treated with nitroarenes. **J. Comp. Pathol.** v. 103, p. 37-48, 1990 b.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.** v. 27, p. 502-22, 1969.

VALDEZ, J., et al. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-Benzimidazole derivatives. **Bioorganics & Chemistry Letters.** v.12, p. 2221-224, 2002.

VIDELA L. A.; GUERRI, C. Glutathione and alcohol. In: VINA, J. (ed). **Metabolism and Physiological Functions.** Boca Raton: CRC Press. p. 57-67, 1990.

WARD, R. F.; TIMOTHY, F. P. **Free Radicals.** 1997.

WEI, Y. D., et al. Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the Tryptophan-derived 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v.383, n. 1, p. 99-107, 2000.

WEISS, D. J. Leukocyte response to toxic injury. **Toxicol. Pathol.** v. 21, p. 135-40, 1993.

WILHELM FILHO, D., et al. Comparative antioxidant defences in vertebrates – emphasis on fish and mammals. **Comparative Biochem. & Physiol.** v. 7, p. 33-45, 2000.

WILHELM FILHO, D.; GONZÁLEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.27, p. 2879-882, 1994.

WILHELM FILHO, D.; MARCON, J. L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. A. L.; RANDAL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA. p. 299-312, 1996.

WINZER, K.; VAN NOORDEN, C. J. F.; KOHLER, A. Sex-specific biotransformation and detoxification after xenobiotic exposure of primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**. v. 59, p. 17-33, 2002.

YANG, S. C.; BRADY, F. J.; HONG, J. Y. Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. **The FASEB Journal**. v. 6, p. 737-44, 1992.

ZAHOOR, A., LAFLEUR, M. V. M., KNIGHT, R. C. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. **Biochem. Pharmacol.** v. 36, p. 3299-304, 1987.

ZHANG, Z.; YU, J.; STANTON, R. C. A method for determination of pyridine nucleotides using a single extract. **Analytical Biochemistry**. n. 285. p. 163-167. 2000.

ANEXOS